

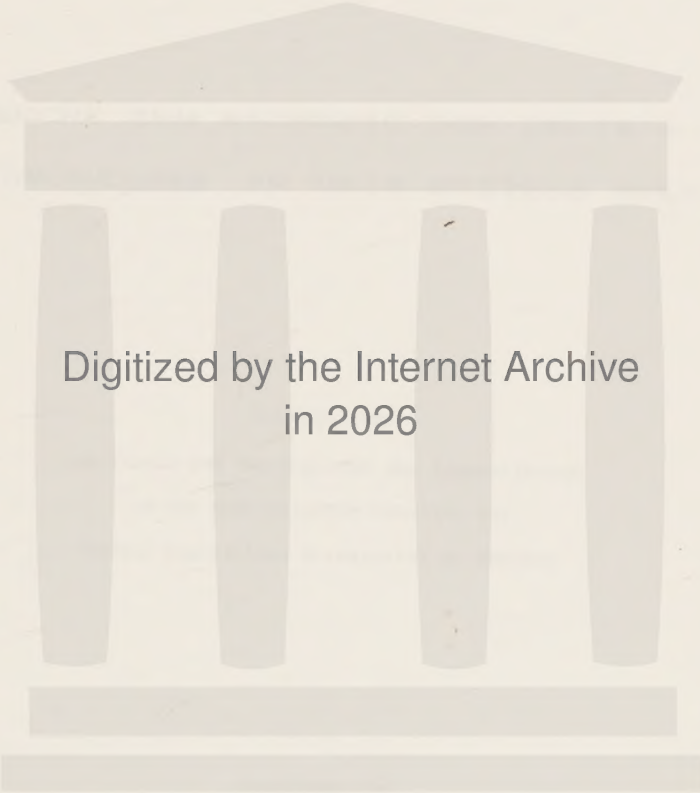
**VERSUCHE ZUM NACHWEIS DER  
DELTA 9 - THC - CARBONSÄURE  
IM URIN MITTELS HPLC**

**KLAUS BLASER**

**1988**

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554816\\_0016](https://archive.org/details/IA41554816_0016)



Aus dem Gerichtsmedizinischen Institut der Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. W. Spann

VERSUCHE ZUM NACHWEIS DER DELTA 9-THC-  
CARBONSÄURE IM URIN MITTELS HPLC

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

KLAUS BLASER

aus

Traunstein

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. L. v. Meyer

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. G. Drasch

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 1988

# Inhaltsverzeichnis

|      |                                                                                |       |    |
|------|--------------------------------------------------------------------------------|-------|----|
| I.   | EINLEITUNG.....                                                                | Seite | 3  |
| II.  | HERKUNFT UND BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN<br>DES DELTA 9-THC-MOLEKÜLS               |       |    |
|      | 1. Herkunft und Inhaltsstoffe des Haschischs                                   |       | 4  |
|      | 2. Herstellung.....                                                            |       | 8  |
|      | 3. Konsumformen und Metabolismus.....                                          |       | 10 |
|      | 4. Biochemischer Wirkungsmechanismus des<br>delta 9-THC.....                   |       | 14 |
|      | 5. Psychische und physische Wirkungen des<br>delta 9-THC auf den Menschen..... |       | 15 |
| III. | NACHWEISMETHODEN, DIE IN DER LITERATUR<br>BESCHRIEBEN SIND                     |       |    |
|      | 1. Nach Williams/Moffat.....                                                   |       | 19 |
|      | 2. Nach El Sohly.....                                                          |       | 20 |
|      | 3. Nach Roesner.....                                                           |       | 21 |
|      | 4. Nach Daldrup.....                                                           |       | 21 |
|      | 5. Nach Abbott und Berg.....                                                   |       | 22 |
|      | 6. Nach Peat.....                                                              |       | 23 |

#### IV. EXPERIMENTELLE ARBEITEN

##### 1. Versuche zum Nachweis der delta 9-THC-

Carbonsäure mittels HPLC.....Seite 24

2. Überprüfung der Ergebnisse..... 50

3. Konzentrationsbestimmungen..... 53

V. DISKUSSION..... 57

VI. ZUSAMMENFASSUNG..... 62

VII. BIBLIOGRAPHISCHE ANGABEN..... 63

## I. Einleitung

In einer Zeit, in der immer mehr illegale Rausch- und Genußmittel konsumiert werden, insbesondere das Haschisch, gewinnen Verfahren zum unanfechtbaren Drogennachweis zunehmend an Bedeutung. Dies gilt sowohl für Polizei und Rechtsprechung als auch für Selbsthilfegruppen ehemaliger Rauschgiftsüchtiger und ähnliches mehr.

Aus diesem Grund erscheint verstärkte Forschungsarbeit auf jenem Gebiet unerlässlich, insbesondere um praktikable, also schnelle und möglichst preiswerte Methoden zu finden. Dies spielt vor allem im täglichen Laborbetrieb eine nicht unerhebliche Rolle.

Von den geläufigen Nachweismethoden wird im folgenden die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) angewendet. Die praktische Durchführung wird durch eine Vielzahl von kleinen Fehlerquellen und Problemen erschwert. Beispielsweise soll durch das Extraktionsverfahren ein Maximum an  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure aus der zur Verfügung stehenden Körperflüssigkeit - in diesem Fall Urin - gewonnen werden. Schließlich steht von einer Person nur ein gewisses begrenztes Urinvolumen zur Verfügung, mit dem möglicherweise auch noch Nachweise zur Bestimmung anderer Substanzen durchgeführt werden müssen.

Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist die Lebensdauer der doch relativ teuren Säulen und des Kapillarsystems im HPL-Chromatographen. Durch mangelhafte Reinigung der aufbe-

reiteten Proben wird das Filter- und Leitungssystem schnell in Mitleidenschaft gezogen. Die Folge sind ungenaue Werte. Übertriebene Reinigungsmaßnahmen haben jedoch zur Folge, daß die delta 9-THC-Carbonsäure zusammen mit den unerwünschten Schmutzpartikeln ausgewaschen wird und somit ebenfalls wenig aussagekräftige Ergebnisse entstehen.

Die Möglichkeit von falsch positiven Resultaten muß unbedingt ausgeschlossen werden; sie würde diese Art des Nachweises von delta 9-THC-Carbonsäure in Frage stellen. Darüber hinaus sollte ein Mindestmaß an falsch negativen Ergebnissen anfallen, das heißt, es wird eine möglichst niedrige Nachweisgrenze angestrebt.

## II. Herkunft und biochemische Grundlagen des Delta 9-THC-Moleküls

### 1. HERKUNFT UND INHALTSSTOFFE DES HASCHISCHS

Aus der weiblichen Pflanze des indischen Hanfes (*Cannabis sativa* Linné) wird mittels noch zu erläuternder Verfahren eine harzähnliche Substanz gewonnen, die landläufig die Bezeichnung HASCHISCH trägt. Man bedient sich hierbei der weiblichen Pflanzen, da sie wesentlich mehr Harzdrüsen an ihren Blütenständen besitzen als die männlichen Pflanzen. Darüberhinaus ist die Zahl und Größe der Harzdrüsen nicht nur vom Geschlecht der Pflanzen, sondern auch von der jeweiligen Sorte abhängig. In Anlehnung an die unterschiedlichen Farben des Haschischs besitzen die verschiedenen Arten Namen

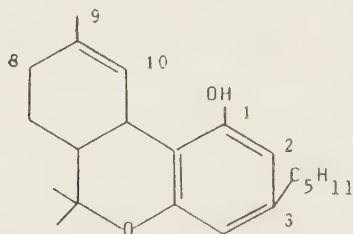
wie "Grüner Türke", "Roter Libanese", "Schwarzer Afghane", "Schwarzer Nepal" oder ähnliches mehr. Dabei deuten die diversen Farbbezeichnungen auch auf die Qualität des Haschischs, also auf seinen THC- oder Harzgehalt hin. Die dunklen, harzreichen Produkte sind als wesentlich "wirkungsvoller" einzustufen als die helleren und billigeren Sorten aus dem Nahen Osten. Die schwarze Farbe des Haschischs entsteht dabei durch die Oxydation des THC, wobei inaktive Verbindungen von dunklerer Farbe entstehen (13).

Die Hanfpflanze produziert ihr Harz u.a., um sich durch dessen biochemische Eigenschaften vor Pflanzenfressern zu schützen und um potentielle Schädlinge durch seine klebrige Konsistenz am Fortkommen zu hindern.

Die Hauptbestandteile des Cannabisharzes stellen vor allem Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabinol (THC) und das Abbauprodukt Cannabinol (CBN) dar. Das Harz besteht aber nicht nur aus cannabinolartigen Verbindungen. Auch Alkaloide, die in viel zu geringer Konzentration vorhanden sind, als daß sie selbst eine Wirkung auf die menschliche Psyche auslösen könnten (13), ätherische Öle, die für den typischen würzigen Geruch von Cannabis verantwortlich sind, Wachsstoffe und Chlorophyll sind Komponenten des Harzes. Die ätherischen Öle, insbesondere das Caryophyllenepoxid, spielen bei der Haschischsuche durch abgerichtete Hunde eine wichtige Rolle. Allerdings sind sie auch in Hopfen, Belfuß und Karotten nachweisbar. Bisher konnten über hundert Inhaltsstoffe nach-

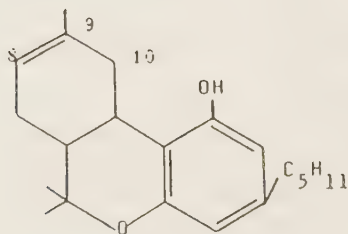
aus den Cannabinoiden. Dabei erwies sich das delta-9-Tetrahydrocannabinol (Bezeichnung nach dem Dibenzopyransystem; nach dem in dieser Arbeit nicht verwendeten Monoterpenoidsystem würde die Bezeichnung delta 1-THC lauten.) als die Substanz mit der intensivsten Wirkung auf die menschliche Psyche. Es ist, abhängig von der Qualität, mit einem Gehalt von ungefähr 5 bis 15 Prozent (cf. Abb. 2) im Haschisch nachweisbar (3).

Abb. 1: Chemische Struktur psychoaktiver Cannabinoide



delta-9-Tetrahydrocannabinol

delta-8-Tetrahydrocannabinol



Weiterhin zählt man das delta 8-THC, das nur in geringsten Mengen (delta 9-THC : delta 8-THC = 99,5 : 1) im natürlichen, das heißt nicht synthetisierten Haschisch vorkommt, und das ebenfalls relativ unbedeutende Tetrahydrocannabinol (THCV), bei dem die Pentylkette des THC durch eine kürzere Propylkette ersetzt ist, zu den psychoaktiven Cannabinoiden (cf. Abb. 1).

Dagegen verfügt das Cannabidiol, das einen bedeutenden Anteil, nämlich bis zu 15 Prozent (13) des Harzes ausmacht, über keinerlei Psychoaktivität (cf. Abb. 2). Es könnte allerdings die Effekte des gleichzeitig vorhandenen THC beeinflussen, und zwar im Sinne einer Verstärkung. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß es durch Isomerisation in delta 9-THC transformiert wird.

Als ein Abbauprodukt und nicht als ein direkt von der Pflanze erzeugter Stoff ist das Cannabinol, das mengenmäßig mit THC und CBD die größte Rolle spielt, aufzufassen (cf. Abb.3). Es entsteht aus CBD und THC durch Oxydation dieser Stoffe. Der Vorgang wird durch Wärmezufuhr noch beschleunigt. Außerdem lassen sich in sehr jungen Pflanzenzellen noch die Säureformen von THC und CBD, also THCS und CBDS, die beide nicht psychoaktiv sind und erst im Laufe der Zeit durch Wärmeeinwirkung in die aktiven Formen gewandelt werden, nachweisen (13).

Das delta 9-THC findet man auch im sogenannten "Marihuana", wenn auch in geringerer Konzentration als im Haschisch (ca. 1 bis 3 Prozent (3)).



Bei Marihuana handelt es sich um Blätter und Blüten des indischen Hanfes (cf. Abb. 2).

Abb. 2: THC-Gehalt (in Gewichtsprozent) in verschiedenen Zubereitungsformen (13)

Haschisch: 1,5 - 11,0 (Durchschnitt: 6,0)

Marihuana: 0,1 - 8,0 (Durchschnitt: 3,0)

Haschöl: 6,0 - 30,0 (Durchschnitt: 15,0)

Das sogenannte Haschöl beinhaltet bis zu 30 Prozent der psychotropen Substanz (13), nach anderen Angaben bis über 50 Prozent (3).

## 2. HERSTELLUNG

Die Produktion des Haschischs kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen.

Zum einen können die harzhaltigen Drüsen der lebenden Cannabispflanze zwischen den Handflächen gerieben werden und die aus den aufgebrochenen Drüsen freigewordene Harzmasse zu kleinen Klümpchen geformt werden. Die Klümpchen sollten darauf in einem Mörser so lange gewalkt werden, bis eine homogene, speckige Masse entsteht. Das Haschisch kann nun in Kugelform, die die beste Lagerungsart darstellt aufgrund der geringen Oberfläche und somit der geringsten Oxydation von THC zu CBN, oder in Versandform gepreßt werden. Bei letzterer Art handelt es sich um plattenartige Gebilde, die vor-

zugsweise in dunklen Plastiktüten aufbewahrt werden, um Licht- und Luftzutritt zu verhindern.

Bei der zweiten Methode werden die getrockneten Pflanzen über einem Sieb ausgeschüttelt, wobei die schweren Drüsenköpfe als erste abfallen. Der so gewonnene Harzstaub kann nun manuell oder mit mechanischen Hilfsmitteln gepreßt werden.

Bei der Herstellung des Haschöls wird der das psychotrope THC enthaltende Harzanteil von den unwirksamen Pflanzenteilen separiert. Dies kann einerseits durch Destillation erfolgen, andererseits durch verschiedene Extraktionsverfahren. Bei letzterer Methode werden die Pflanzen in ein Lösungsmittel gelegt, das sie auslaugt und dabei alle Cannabinoide aufnimmt. Geeignete Lösungsmittel hierfür sind zum Beispiel Tri- oder Dichlormethan, Benzol, Petrolether und ähnliches mehr. Die Feststoffe werden anschließend abgefiltert und das Lösungsmittel bei relativ geringer Temperatur verdampft, so daß die Cannabinoide dabei geschont werden können. Nach dem Verdampfen bleiben nur Harz und einige Farbstoffe übrig, so daß sich hohe Konzentrationen an THC (cf. Abb. 2) ergeben.

Bei der Herstellung der Cannabinoide im Labor fällt praktisch nur das leichter synthetisch darstellbare delta 8-THC an, das auch bei der Überprüfung der Ergebnisse im experimentellen Teil der Arbeit Verwendung findet.

### 3. KONSUMFORMEN UND METABOLISMUS

Prinzipiell herrschen zwei Einnahmearten der Droge vor, nämlich das Rauchen und das Essen des Haschischs.

Bei der Herstellung eines sogenannten "Joints" wird der Tabak mit gekrümeltem Haschisch vermischt. Die Wirkung der psychotropen Cannabinoide setzt kurz nach Beginn des Rauchens ein. Dabei verdampfen die in der Nähe der Glut vorhandenen Cannabinoide bei 200 bis 300 Grad Celsius. Beim Inhalieren gelangen sie mit dem Rauch in die Lunge, wo sie abkühlen und sich mit den anderen Rauchbestandteilen als feinste Tröpfchen auf den Lungenbläschen ablagern. Dort werden sie an das sauerstoffreiche Blut gebunden und auf diesem Weg in den Organismus ausgeschwemmt. Wegen der teilweisen Umwandlung von THC durch Oxidation zu CBN in der Zigarettenglut und aufgrund vorzeitiger Kondensation in der Mund-Rachen-Region gelangen circa nur 40 bis 50 Prozent der Cannabinoide in die Lunge (34). Durch das extrem tiefe Inhalieren beim Cannabisrauchen kommt es außerdem zu einer sehr starken Belastung des Körpers durch die anderen toxischen und kancerogenen Stoffe, die im Tabak enthalten sind.

Bei der anderen erwähnten Konsumform, dem Essen der Cannabinoide, werden letztere verschiedenen Nahrungsmitteln, wie zum Beispiel Kuchen oder Tee zugesetzt. Es existieren sogar regelrechte Cannabis-Kochbücher mit unterschiedlichsten Rezepten.

Nach der Nahrungsaufnahme erfolgt im Magen-Darm-Trakt die

Resorption der Cannabinoide zusammen mit den anderen Speisebestandteilen. Sie verteilen sich so zunächst über den venösen und später über den arteriellen Kreislauf im Körper.

Die Resorptionsgeschwindigkeit der Cannabinoide ist dabei indirekt proportional zur Menge der aufgenommenen Nahrung. Im allgemeinen setzt die Wirkung nach einer bis vier Stunden ein und erreicht nie die gleiche Intensität wie die gleiche Haschischmenge beim Rauchen. So beträgt nach (13) die Mindestmenge, um den gewollten Effekt zu erzielen, beim Essen circa 10 mg THC, beim Rauchen nur circa 1 bis 2 mg THC.

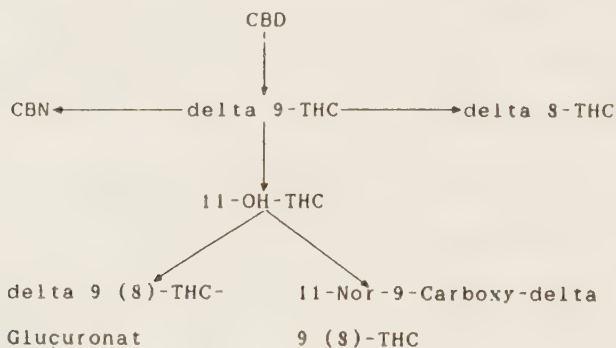
Wird dem Körper auf die eine oder andere Weise delta 9-THC zugeführt, so kommt es aufgrund der Lipophilie des Moleküls mehr oder weniger schnell zu einer Akkumulation in verschiedenen fetthaltigen Organen. Hierbei sind in unterschiedlichem Maße vor allem Leber, Herz, Lunge und das Fettgewebe bevorzugt.

Es erfolgt also keine gleichmäßige Verteilung im Körper, wie auch bei Ethanol, das sich im Gegensatz dazu aber im Körperwasser verteilt.

Während einige Autoren (3) eine biologische Halbwertszeit von circa 5 Tagen angeben, berichten andere (36) davon, daß in Tierversuchen 80 bis 90 Prozent der Cannabinoide nach sechs Stunden ausgeschieden wurden und der Rest den Körper langsamer verläßt. Da es sich bei den psychoaktiven Cannabinoiden um hydrophobe Moleküle handelt, bedarf es einer chemischen Modifikation im Körper, um sie löslich zu machen.

Erst dann ist eine Ausscheidung über die Nieren möglich. Dazu werden die Moleküle vor allem in der Leber hydroxyliert und anschließend zur THC-Säure oxidiert, teilweise aber auch mit Glucuronsäuren gekoppelt (cf. Abb. 3 und Abb. 4).

Abb. 3: Metabolismus der Cannabinoide

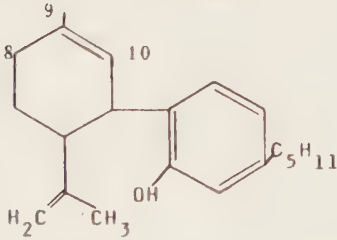


Wie in Abbildung 3 deutlich wird, ist das Endprodukt dieser Hydroxylierung das 11 OH-delta 9-THC, das wiederum zum 11-Nor-9-Carboxy-delta 9-THC weiteroxidiert wird (3).

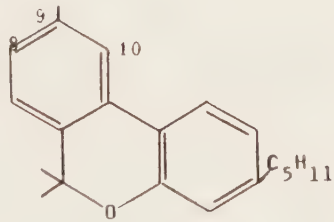
Die chemischen Formeln hierzu sind in Abbildung 1 und 4 dargestellt. In Abbildung 3 wird auch angedeutet, daß CBD durch Isomerisation in delta 9-THC übergeführt werden kann, andererseits das delta 9-THC zum Beispiel bei Überalterung der Droge zum inaktiven CBN umgebaut wird.

Diese beiden Vorgänge spielen sich extrakorporal im Haschisch ab.

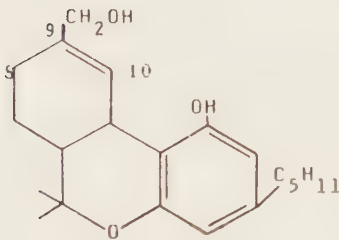
**Abb. 4:** Chemische Struktur nicht psychoaktiver Cannabinoide und Metaboliten des delta 9-THC



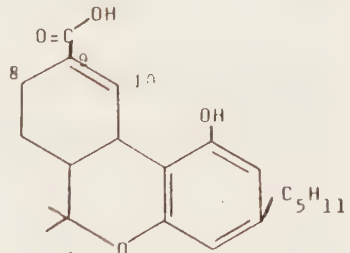
Cannabidiol (CBD)



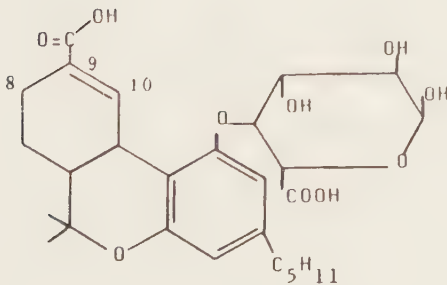
Cannabinol (CBN)



11-OH-delta 9-THC



11-Nor-9-Carboxy-  
delta 9-THC



11-Nor-9-Carboxy-  
delta 9-THC-Glu-  
curonat

Die Ausscheidung der Cannabinoid-Metaboliten erfolgt zu 75 bis 80 Prozent im Kot (36), der für den Nachweis ungeeignet ist. Nur 20 bis 25 Prozent gelangen im Urin nach außen, wobei sich der Nachweis wegen der Säureeigenschaften der untersuchten Metaboliten schwierig gestaltet.

Für einen erfolgreichen Nachweis der Cannabinoide im Urin ist außerdem entscheidend, wieviel Zeit seit dem Cannabisgenuß vergangen ist.

Andere Verfahren versuchen, über den Nachweis der Cannabinoide in Blut, Speichel oder Handschweiß erfolgreich zu sein.

#### 4. BIOCHEMISCHER WIRKUNGSMECHANISMUS DES DELTA 9-THC

Das delta 9-THC kommt zwar in ähnlicher Konzentration wie die natürlichen Neurotransmitter im Gehirn vor, weist jedoch, was seine chemische Struktur und Ladung betrifft, keinerlei Übereinstimmungen mit diesen auf.

So besteht auch bisher noch keine eindeutige Klarheit über den genauen Wirkstoffmechanismus. Immerhin existieren zwei Denkmodelle, die diesen Prozeß zu erklären versuchen.

Gemäß der ersten Überlegung, der sogenannten Membranhypothese (3), soll sich das hydrophobe Molekül des delta 9-THC in der Lipidschicht des Neurolemms lösen. Dadurch bewirkt es eine Umänderung der Permeabilität. Diese Wirkungsweise stimmt mit der allgemeinen Narkosetheorie überein.

Eine zweite Möglichkeit, bekannt als Rezeptorhypothese, geht von der Existenz eines hochspezifischen delta 9-THC-Rezep-

tors aus, vergleichbar dem bei Opiaten. Dafür spricht auch die Höhe der Konzentration von delta 9-THC im Gehirn, die der anderer Neurotransmitter fast gleich ist.

Ein weiteres Argument für die Rezeptorhypothese ist die Unwirksamkeit der Droge selbst bei geringfügigen chemischen Veränderungen am delta 9-THC-Molekül.

## 5. PSYCHISCHE UND PHYSISCHE WIRKUNGEN DES DELTA 9-THC AUF DEN MENSCHEN

Die Auswirkungen des Cannabiskonsums auf die menschliche Psyche sind, abhängig von seinem Ausmaß und der Aufnahmeform, vielfältiger Natur.

Ganz allgemein kommt es in der Folge oft zu einer Verstärkung bereits präexistenter Gemütszustände, wobei in überwiegendem Maße Euphorie auftritt. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß der "Kiffer" bereits mit einer positiven Grundeinstellung und einer gewissen Vorfreude den Haschkonsum beginnt.

Der Körper fühlt sich leicht und schwebend an, der Motivationsgrad wird herabgesetzt. Außerdem verliert der Haschkonsument die Fähigkeit zur richtigen Einschätzung der eigenen Arbeit und der dabei erzielten Ergebnisse (13):

er sieht sich und seine Leistungen als zu positiv. Im Bereich der sinnlichen Wahrnehmung fällt eine Verstärkung der Farb- und Tiefenperzeption auf. Weiterhin scheinen die Versuchspersonen rein subjektiv besser zu hören.

Sehr oft tritt während des Rauchzustandes verstärkter

Appetit auf. Dies ist auf die Intensivierung des Geschmacks- und Geruchssinnes zurückzuführen. Darüberhinaus verändert die Droge das normale Zeitempfinden: die Zeit vergeht subjektiv erheblich langsamer. Die Probanden zeigen auch eine Veränderung ihrer Reaktionsfähigkeit. Ihre Reaktionszeit nimmt dosisabhängig zu. Dies hat eindeutig negative Auswirkungen auf die Verkehrstüchtigkeit (20, 26, 27, 39). Auch nimmt die Konzentrationsfähigkeit (13) stark ab.

Eine geringere Dosis THC zeigt bei Versuchspersonen sedative Wirkungen und ermöglicht einen ruhigen und erholsamen Schlaf. Außerdem bewirkt Cannabis eine Verlängerung der täglichen Schlafzeit um circa 15 bis 30 Prozent (44). Das Sexualverhalten zeichnet sich durch ein intensiveres Erleben von Sinneseindrücken aus.

In Bezug auf das Sozialverhalten erweist sich Cannabis als eindeutig soziogen, im Unterschied zu Opiaten, Amphetaminen und Barbituraten, die alle mehr oder weniger ausgeprägt zu einer Isolierung des Individuums führen (13). Des weiteren läßt nach Genuß von Haschisch die Aggressivität nach (17), was auf die bereits erwähnte positive Grundeinstellung zu Beginn des Haschischrauchens zurückzuführen sein dürfte.

Bei den beschriebenen Auswirkungen des "Haschens" handelt es sich lediglich um vorübergehende, nur während des Rauschzustandes anhaltende Symptome. Bei regelmäßigem, sich über längere Zeit hinziehendem THC-Gebrauch kann es jedoch zum

Ausbruch unterschwellig vorhandener Probleme oder Krankheitszustände kommen.

Während man bei den psychischen Auswirkungen weitgehend auf subjektive, schwer nachzuprüfende Angaben der Versuchspersonen angewiesen ist, lassen sich die körperlichen Folgen objektiv nachweisen. So ist es experimentell bewiesen (Literatur in 13), daß bereits kurz nach dem Rauchen die Herzfrequenz dosisabhängig auf bis zu 100 Schläge pro Minute zunimmt, um nach circa 40 Minuten wieder Normalwerte zu erreichen. Dies hat zwar im Normalfall keine negativen Auswirkungen, kann aber bei chronischem THC-Abusus bei Angina pectoris gefährdeten Patienten entsprechende Anfälle noch mehr begünstigen als der Konsum von einfachen Tabakzigaretten (45).

Selten treten gelegentliche Herzrhythmusstörungen auf. Auch eine Zunahme des Blutdrucks konnte von einigen Forschern nachgewiesen werden (17, 19, 21, 50, 59). In der Mundhöhle finden sich sehr häufig Sikkasymptome, die auf den atropinartigen Effekt zurückzuführen sind. Gerötete Augen und Konjunktivitis sprechen für eine Vasodilatation in diesem Gebiet. Die angesprochene Symptomatik ist geradezu typisch für den chronischen "Kiffer".

Vom Schadstoffgehalt her unterscheiden sich die "Joints" durch nichts von normalen Zigaretten. Um möglichst viel THC aufzunehmen, wird jedoch extrem tief inhaliert und der Rauch

lange im pulmonalen System retiniert. So kommt es zu einer wesentlich höheren Schadstoffkonzentration in der Lunge und zu einer Herabsetzung des Atmungsvolumens wie bei sechzehn normalen Zigaretten (56). Weiterhin scheint die Infektionsabwehr der Lunge gegen *Staphylococcus aureus*, dem Erreger einer Pneumonieform, herabgesetzt (18). Auch eine generalisierte Suppression der Infektabwehr ist denkbar (45), sie muß aber nicht eintreten (35).

Bei chronischer Cannabisanwendung kommt es im Laufe der Zeit zur Toleranzentwicklung (12, 22, 23), die sowohl die psychische als auch physischen Bereiche betrifft (40). Die Ausbildung der Toleranz verläuft jedoch relativ langsam, insbesondere wenn man damit andere Drogen, zum Beispiel LSD, vergleicht. Bei letzterem Rauschmittel ist bereits am zweiten Tag fast die doppelte Menge nötig, um den gleichen Effekt wie am Vortag zu erzielen. Das Phänomen der Toleranzentwicklung spricht auch für ein Cannabinoidrezeptorsystem, das bisher aber noch nicht entdeckt werden konnte (cf. Kapitel II/4).

Im Laufe der Zeit entwickelt sich neben den körperlichen Schäden auch ein gewisses Maß an Lethargie und Motivationslosigkeit, die eine normale Mitwirkung der Kranken im Arbeits- und Sozialleben beinahe unmöglich macht. Weiterhin greift nach einiger Zeit der Großteil der chronisch Haschabhängigen zu stärkeren Drogen wie LSD oder Heroin mit ihren katastrophalen Folgen. Deshalb stellt eine geeignete Prä-

vention und Aufklärung Jugendlicher eine *Conditio sine qua non* dar. Aber auch bereits aktiven Haschern sollte die Chance gegeben werden, sich von der Droge loszureißen, wozu jedoch sichere und schnelle Nachweismethoden unersetzlich sind.

### III. Nachweismethoden, die in der Literatur beschrieben sind

Von verschiedenen Autoren werden im Schrifttum diverse Techniken und Variationen zum Nachweis der Metaboliten des delta 9-THC angegeben. Die geläufigen Nachweisverfahren laufen auf drei Methoden hinaus:

- HPLC ohne und mit Radio Immuno Assay;
- Dünnschichtchromatographie;
- EMIT - d.a.u.

In dieser Arbeit soll jedoch nur auf die Möglichkeit des Nachweises mittels HPLC eingegangen werden, wobei die anderen Methoden allerdings teilweise zur Überprüfung und zum Vergleich der erzielten Ergebnisse benutzt wurden.

#### 1. NACH WILLIAMS / MOFFAT (60):

Die Urinprobe wird mit Phosphorsäure auf pH3 eingestellt und anschließend einmal mit einem 80% Ether - 20% N - Propanol-Gemisch extrahiert. Die organische Phase wird unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand in 100 Mikroliter Methanol (bei 200 ml Urinausgangsvolumen) gelöst.

Das durch die Aufbereitung gewonnene Probenvolumen wird als Ganzes in den Chromatographen injiziert. Dabei wird das Eluat sowohl durch ein Photometer als auch durch eine Kontrolle der Fraktionen, die während der HPLC angefertigt werden, mit Hilfe eines Radio Immuno Assays überprüft.

Der Flow soll 4,0 ml/min betragen, das Fließmittel ist ein auf pH 3 eingestelltes Acetonitril : Wasser - Gemisch (35 : 65). Die Messung erfolgt mit Licht der Wellenlänge 210 nm. Als Säule wird eine 10 cm x 4,6 mm i.d. ODS Hypersil benutzt.

## 2. NACH EL SOHLY (9):

Der Urin (10 ml) wird mit 2,0 ml 10 N KOH vermischt und für 15 Minuten bei 50°C hydrolysiert. Danach wird mit HCl auf pH 5 - 6 eingestellt.

Die auf ein Vakuumgerät gesteckten Säulen konditioniert man mit 4,0 ml Methanol und danach zweimal mit 4,0 ml Aqua bidest.

Nach dem Aufsetzen eines Reservoirs wird zuerst 1,0 ml 1 M HCl und anschließend der hydrolysierte Urin unter Vakuum auf die Säule gegeben. Danach werden die Säulen mit 10 ml 0,1 M HCl, gefolgt von 25 ml Acetonitril : 50 nM Phosphorsäure (1 : 9) gewaschen. Nach dem Entfernen des Reservoirs eluiert man mit 1,5 ml Acetonitril. Vom Eluat sind jeweils 20 Mikroliter in den Chromatographen einzuspritzen.

Als Fließmittel dient ein Gemisch aus Acetonitril und 50 mM Phosphorsäure (6,5 : 3,5) bei einem Flow von 1,6 ml/min. Die Wellenlänge des Photometers beträgt 214 nm; bei der Säule handelt es sich um eine 25 cm × 4,6 mm ID C8 Reversed Phase Säule mit 5 Mikrometer Partikelgröße.

Den Angaben des Autors zufolge soll die Nachweisgrenze bei ca. 25 ng/ml liegen.

### 3. NACH ROESNER (51):

Die Tischvorlage nach Roesner entspricht weitestgehend dem Verfahren, das El Sohly angibt. Nur die Konditionierung der Bond - Elut - Säulchen erfolgt leicht modifiziert (zusätzlich 4,0 ml 0,1 N HCl). Außerdem wird das Probenvolumen direkt auf die Säule gegeben (ohne 1,0 ml 1 M HCl).

### 4. NACH DALDRUP (6):

Der Autor beschreibt in seiner Anleitung die Aufbereitung von Blut bzw. Serum wie folgt.

1,0 ml Serum wird mit 50 Mikroliter  $\beta$ -Glucuronidase bei 37°C für 20 Stunden inkubiert. Anschließend gibt man 3,0 ml Methanol zu, schüttelt die Proben 2 Minuten am Vortex und zentrifugiert sie dann bei 3000 upm. Nach einer Lagerzeit von 20 Stunden bei 4°C wird der Überstand (ca. 1,5 ml) unter Stickstoff eingeengt. Der Rückstand ist in 100 Mikrolitern Methanol : 1 M Ameisensäure (1 : 1) zu lösen.

Das Probevolumen wird nun in den Chromatographen injiziert.

Als Fließmittel dient Methanol : 0,01 M Ameisensäure

(75 : 25) bei einem Flow von 1,0 ml/min. Bei der Säule handelt es sich um eine Nucleosil C 18-7; die Detektion erfolgt bei 220 nm.

Gleichzeitig werden Fraktionen hergestellt und das dadurch gewonnene Volumen unter Stickstoff eingeeengt. Den Rückstand löst man wieder in Methanol (50 Mikroliter). Er kann nun durch einen EMIT-Test überprüft werden.

#### 5. NACH ABBOTT UND BERG (1):

Das Urinvolumen wird mit  $\beta$ -Glucuronidase / Arylsulfatase für 20 Stunden bei 34°C inkubiert und danach konzentriert. Das Konzentrat füllt man mit Aqua dest. auf 10 ml auf und stellt ein pH von 8 ein. Darauf wird mit Hexan (I) extrahiert, auf pH 12 angeglichen, mit Ether (II) extrahiert, auf pH 2,5 eingestellt und schließlich wiederum mit Ether (III) extrahiert. Das letzte Extrakt wird dreimal mit 8,0 ml 2% NaOH (pH 8,8) extrahiert.

Die Etherphase wird auf pH 2,5 eingestellt und mit Ether (IV) extrahiert.

Alle vier Extrakte engt man unter Stickstoff ein und löst die Rückstände in je 50 Mikroliter Methanol.

Dabei sollen nach den Ergebnissen der Autoren den vier verschiedenen Extrakten folgende Substanzen zugeteilt werden können:

- Extrakt I : THC, CBN, CBD, Monohydroxymetaboliten
- Extrakt II : Polyhydroxymetaboliten

- Extrakt III: schwach polare Säuren
- Extrakt IV : stärker polare Säuren

Als Säule dient eine 25 cm x 2,1 mm IC Varian MicroPak MCH - 10 Column. Bei verschiedenen Wasser - Acetonitril Gradienten erfolgt Aufgabe der einzelnen Extrakte in den Chromatographen. Die Detektion erfolgt sowohl bei 215 nm als auch bei 280 nm, wobei der Extinktionskoeffizient des delta 9-THC nach Angabe der Autoren bei 215 nm wesentlich größer ist als bei 280 nm.

#### 6. NACH PEAT (42):

2,0 ml Urin werden mit 2,0 ml Methanol vermischt und schließlich mit 2,0 ml einer Methanol - Wasser - Mischung (pH 5,5). Die Lösung wird zentrifugiert, 5,0 ml des Überstandes abpipettiert. Man gibt das ganze Volumen des Überstandes direkt auf die HPLC-Säule (Spherisorb - 005/5 Mikrometer, 10 cm c 4,6 mm). Bei einem Flow von 4,0 ml min<sup>-1</sup> ändert sich die Zusammensetzung des Fließmittels (Wasser : Acetonitril) mit fortschreitender Zeit zugunsten des Acetonitrils. Die Wellenlänge des Detektors beträgt 215 nm. Alle 30 Sekunden wird fraktioniert, die Fraktionen werden anschließend eingeengt. Die Rückstände löst man in je 400 Mikroliter, wovon 50 bzw. 100 Mikroliter mittels RIA analysiert werden.

Der Nachweis der delta 9-THC-COOH durch Radio Immuno Assay (kombiniert mit der HPLC), wie er von einigen Autoren beschrieben wird, ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Vielmehr soll versucht werden, durch geeignete Methoden die delta 9-THC-COOH allein durch die HPLC nachzuweisen.

#### IV. Experimentelle Arbeiten

##### 1. VERSUCHE ZUM NACHWEIS DER DELTA 9-THC-CARBONSÄURE MITTELS HPLC

Als Ausgangsbasis für die folgenden Darstellungen diene eine Versuchsbeschreibung, die von v. Meyer (37) für die Analyse der delta 9-THC-Carbonsäure mittels Dünnschichtchromatographie angegeben wurde. Auf der Grundlage dieser Versuchsanordnung sollte ihre Anwendbarkeit für die HPLC überprüft werden und eine Reihe von Modifikationen in unterschiedlichem Ausmaß zu einer Verfeinerung dieser zunächst nicht für die HPLC entwickelten Nachweismethode führen.

Die für die Untersuchungen benutzten Urinproben stammten von Selbstkontrollgruppen, Drogennachsorgegruppen und ähnlichen Institutionen.

Zur Einführung in die Methodik und zur besseren Übersicht seien nachfolgend diejenigen Geräte beziehungsweise Materialien aufgeführt, die in den anschließend beschriebenen Versuchsvarianten benutzt wurden:

- Materialien: Essigsäure (96%ig);

- KOH in verschied. Molaritäten und Lösungen;

Methanol pro Analyse;

$\text{NaHCO}_3$  (5%ig);

Aceton, pro Analyse;

Ameisensäure (0,01 M);

Aqua dest.;

Baker - 10 SPE<sup>TM</sup> Octadecyl ( $\text{C}_{18}$ ) Disposable  
Columns (7020/1) 3 ml;

Baker - 10 SPE<sup>TM</sup> Disposable Filtration  
Columns (7121/6) 6 ml;

- Geräte: Baker-Probensammelgläser (7019/2) 2 ml;  
Vakuumgerät (Vac Elut<sup>TM</sup>, Analytichem International);  
Heizblock und Rotavapor;  
Vortex;  
HPLC: Säule ( $\text{C}_{18}$  - Nucleosil)  
Lampe 214 nm und Lampe 229 nm;  
Zentrifuge.

#### 1.1 Probenvorbereitung:

10 ml Urin werden mit 3,0 ml 10%iger methanolischer KOH versetzt und im Heizblock bei 100°C zwölf Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 5,0 ml Essigsäure zugegeben, so daß sich ein pH von ca. 3,5 einstellt.

#### Säulenvorbereitung:

Nach dem Aufsetzen der Säulchen auf das Vakuumgerät werden die Filter mittels eines Adapters auf den Säulen

befestigt. Zum Konditionieren der Säulen spült man unter Vakuum nacheinander mit zweimal 1,0 ml Methanol und zweimal 1,0 ml Aqua dest. Das Trockensaugen der Säulen muß vermieden werden, weshalb das Vakuum sofort nach dem Durchlaufen der Flüssigkeiten abzustellen ist.

#### Probenaufgabe:

Der Urin wird im Vakuum, das ca. 5" Hg betragen sollte, aufgegeben. Nach vollständigem Durchlauf wird das Vakuum abgeschaltet und der Filteraufsatz entfernt.

#### Säulenwäsche:

Die Säule wird nun mit jeweils 1,0 ml Aqua dest.,  $\text{NaHCO}_3$  und noch einmal Aqua dest. gespült. Das Vakuum beläuft sich dabei auf ungefähr 5" Hg. Nach dem Waschen wird das Vakuum ausgeschaltet, 50 Mikroliter Aceton werden auf die Säule pipettiert und das Vakuum - jetzt 15" Hg - wird für fünf Minuten angelegt, um die Säule trockenzusaugen.

#### Elution:

Die Stahlnadeln sind mit Zellstoff zu säubern, bevor das Gestell mit den Gläsern eingesetzt wird. Man eluiert mit Aceton: 200 Mikroliter Aceton auf die Säule geben, das Vakuum anlegen (5" Hg) und noch einmal 200 Mikroliter Aceton hinzupipettieren. In den Chromatographen werden jeweils 10 Mikroliter des gewonnenen Eluats injiziert.

Ergebnisse: Die gewonnene Probe war zwar einigermaßen sauber, doch gelang der Nachweis für die delta 9-THC-

Carbonsäure nicht einwandfrei. Außerdem dürfte das Aceton sich mit seiner starken Eigenabsorption negativ auswirken.

1.2 Das Urinvolumen von 10 ml wird wie in Versuch 1.1 aufbereitet und extrahiert. Allerdings wird mit zweimal 200 Mikroliter Methanol eluiert (statt mit der gleichen Menge Aceton). Vom Eluat werden ebenfalls 10 Mikroliter als Probe in den Chromatographen gegeben.

Ergebnisse: Die Elution mit Methanol verbesserte die Ergebnisse nicht. Der Nachweis war ebenso unsicher wie in 1.1.

1.3 Die Aufbereitung des Urins und die Extraktion erfolgen genauso, wie unter 1.1 beschrieben wurde. Außerdem wird das Eluat (Aceton) anschließend am Rotavapor bei ca. 50°C eingeeengt. Der Rückstand wird in 60 Mikroliter Methanol gelöst, wovon jeweils 10 Mikroliter in den Chromatographen gespritzt werden.

Ergebnisse: Durch das Einnengen und Konzentrieren (von 400 Mikroliter auf 60 Mikroliter) wurde der Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure wesentlich verbessert.

1.4 Nach der Aufbereitung und Extraktion wird anstatt mit zweimal 200 Mikroliter Aceton mit der gleichen Menge Methanol eluiert. Das Eluat wird ebenfalls eingeeengt und

der Rückstand in 60 Mikroliter Methanol gelöst.

Ergebnisse: Die Elution mit Methanol und anschließendem Einengen erbrachte schlechtere Ergebnisse als die Elution mit Aceton und darauffolgendem Einengen und Lösen in Methanol (cf. Versuch 1.3).

#### 1.5 Probenvorbereitung:

Der Urin (10 ml) wird nicht hydrolysiert, d.h. er wird weder mit KOH und Eisessig versetzt noch erhitzt.

Was die restlichen Punkte anbelangt, so wird hier wie in 1.3 verfahren.

Ergebnisse: Das Eluat, das von dieser nicht hydrolysierten Urinprobe gewonnen wurde, war stark mit Partikeln verunreinigt. Aufgrund der damit verbundenen Gefahren für Chromatographiesäule und Kapillarsystem wurde diese Art der Aufbereitung nicht weiterverfolgt. Auch das Zentrifugieren des Eluats brachte keine wesentliche Verbesserung der Reinheit.

#### 1.6 Ohne irgendwelche Versuchsparameter zu verändern, wird die Säule nach je 1,0 ml Aqua dest., NaHCO und Aqua dest. mit 1,0 ml 10%iger methanolischer Lösung gespült. Auch Elution und Einengen sind identisch zu 1.3.

Ergebnisse: Das Waschen der Säule mit methanolischer Lösung verbesserte die Ergebnisse. Die störenden Peaks

bei den Leerproben, d.h. bei Urinen, die nicht mit delta 9-THC-Carbonsäure angereichert waren, wurden wesentlich kleiner. Außerdem, war bereits rein optisch erkennbar, daß die auf diese Weise aufbereiteten Proben im allgemeinen weniger stark mit Partikeln verunreinigt waren. Um die Ergebnisse zu überprüfen, wurde mehrere Male an den Stellen fraktioniert, an denen die Peaks der delta 9-THC-Carbonsäure auftreten sollten. Als Referenz diente dabei die synthetische delta 8-THC-Carbonsäure. Die Fraktionen wurden eingeengt, die Rückstände in 150 Mikroliter Methanol gelöst und mittels EMIT, der für die betreffenden Stellen - nämlich einmal für die artifizielle delta 8-THC-Carbonsäure und das zweite Mal für die im Urin enthaltene delta 9-THC-Carbonsäure - positiv ausfiel, überprüft. Diese Fraktionierung wurde bei verschiedenen positiven Urinproben durchgeführt. Dabei wurden jeweils Doppelansätze hergestellt - einmal mit und einmal ohne die delta 8-THC-Carbonsäure. Dadurch konnte unterschieden werden, welcher Peak zu welcher THC-Carbonsäure gehörte.

1.7 Probenvorbereitung, Säulenkonditionierung und Probenaufgabe laufen nach dem in 1.6 beschriebenen Schema ab. Bei der Säulenwäsche jedoch wird auf  $\text{NaHCO}_3$ , Aqua dest. und auf methanolische Lösung verzichtet. Man saugt lediglich mit 50 Mikroliter Aceton trocken. Eluiert wird mit zweimal 400 Mikroliter Aceton. Das Eluat wird wieder

eingeeengt und in 60 Mikroliter Methanol gelöst.

Ergebnisse: Die Proben waren sehr stark verunreinigt wegen der fehlenden Säulenwäsche. Dieses Vorgehen erwies sich somit als unbrauchbar für den Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure mittels HPLC.

#### 1.8 Probenvorbereitung:

Anstatt 10%iger methanolischer KOH wird 7 N KOH (ebenefalls 3,0 ml) für die Hydrolyse verwendet. Die anderen Bedingungen sind den unter 1.3 aufgeführten gleich.

Ergebnisse: Die Verwendung von 7 N KOH wirkt sich positiv auf das Resultat aus. Um die Ergebnisse zu überprüfen, wird an den entscheidenden Punkten wiederum fraktioniert. Der EMIT fällt positiv aus.

1.9 Für die Probenaufbereitung werden verschiedene Volumina desselben Urins (10 ml; 5,0 ml; 2,0 ml; 1,0 ml; 0,5 ml) benutzt, wobei die Differenz zu 10 ml jeweils mit Aqua dest. aufgefüllt wird.

Die Hydrolyse und die anderen Schritte entsprechen dem Vorgehen bei 1.6.

Ergebnisse: Um eine Vergleichsmöglichkeit bei verschiedenen Ulinmengen zu besitzen, wurde diese absteigende Reihe verschiedener Volumina aufgestellt. Es ergab sich eine nicht ganz lineare Abhängigkeit der Peakhöhen vom

Ulinvolumen.

| Urinvolumen | Peakhöhe<br>(Mittelwert) | Fläche der Peaks<br>(Mittelwert) | Nachweisbarkeit |
|-------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------|
| 10,0 ml     | 36,0                     | 800                              | Ja              |
| 5,0 ml      | 21,0                     | 480                              | Ja              |
| 2,0 ml      | 11,0                     | 300                              | nein            |
| 1,0 ml      | 6,0                      | 150                              | nein            |
| 0,5 ml      | -                        | -                                | nein            |

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß Urinvolumina von 10 bzw. 5,0 ml nötig waren, um die delta 9-THC-Carbonsäure nachweisen zu können. Unterhalb dieser Mengen gelang dies nicht mehr, da der Einfluß von störenden, interferierenden Peaks bei kleinen Mengen relativ stärker ins Gewicht fiel als bei großen Volumina.

#### 1.10 Probenaufbereitung:

Unterschiedliche Mengen desselben Urins (5,0 ml; 2,0 ml) werden nach dem Auffüllen mit Aqua dest. auf 10 ml mit 2,5 ml 7 N KOH anstatt mit 3,0 ml 10%iger methanolischer KOH versetzt. Die Hydrolyse erfolgt zwölf Minuten lang bei 100°C. Anschließend werden 5,0 ml Essigsäure zugegeben.

Die restlichen Punkte werden vom Versuch 1.6 übernommen. Die Detektion erfolgte sowohl bei 229 nm als auch bei 214 nm.

Ergebnisse: Die Proben waren alle relativ sauber. Die

Resultate bei 229 nm ergaben durchwegs korrekte, d.h. vor allem keine falsch positiven Ergebnisse. Die Überprüfung erfolgte sowohl durch EMIT als auch durch Dünnschichtchromatographie. Dagegen traten bei der Messung mit 214 nm wieder falsch positive Ergebnisse auf. Wie bereits im Versuch 1.9 so wurde auch hier festgestellt, daß ein Urinvolumen von nur 2,0 ml zu wenig ist, um brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

1.11 Probenvorbereitung, Säulenkonditionierung und Proben-  
aufgabe laufen ab wie im Versuch 1.3.

Säulenwäsche:

Nach  $\text{NaHCO}_3$  und Aqua dest. (Je 1,0 ml) werden die Säulen mit unterschiedlichen Mengen an 10%iger methanolischer Lösung gewaschen (1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 10,0 ml; 20,0 ml). Es handelt sich dabei selbstverständlich um Proben des gleichen Urins, um einen objektiven Vergleich zu ermöglichen. Die Elution wird mit zweimal 500 Mikroliter Aceton durchgeführt. Das Eluat wird am Rotavapor eingeengt, der Rückstand in 60 Mikroliter Methanol gelöst.

Der Versuch wird für jede Urinprobe mit und ohne Baker-  
Filtersäulen durchgeführt, um auch hier evtl. bestehen-  
de qualitative Unterschiede herauszuarbeiten.

Ergebnisse: Die Reinigung der Säulen mit unterschiedlich  
großen Volumina methanolischer Lösung führte zu einem

klaren Resultat. Die verbleibende Menge an delta 9-THC-Carbonsäure nahm zwar mit steigender Menge an methanolischer Lösung, ab, führte jedoch auch zu einer verbesserten Reinigung der Proben.

Abb. 5: Chromatogramm einer nach 1.10 aufbereiteten Urinprobe.

Die Wellenlänge des Detektors betrug 229 nm. Der Peak der delta 9-THC-Carbonsäure trat bei 6,51 Minuten (↑) auf.

Plotting Factors: 2550.

Extinktion

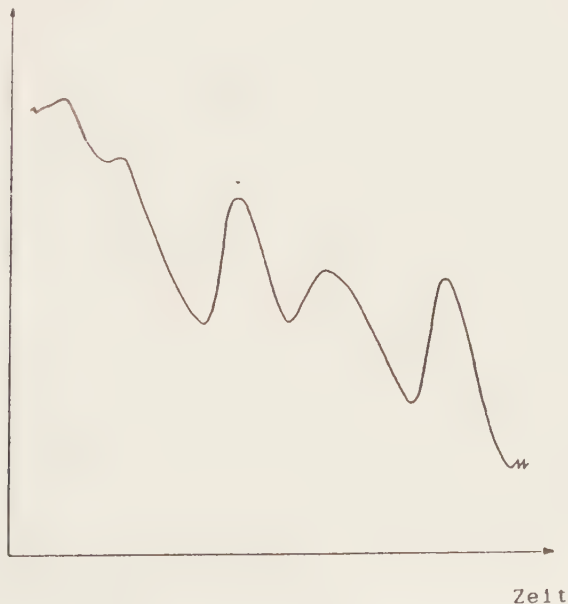
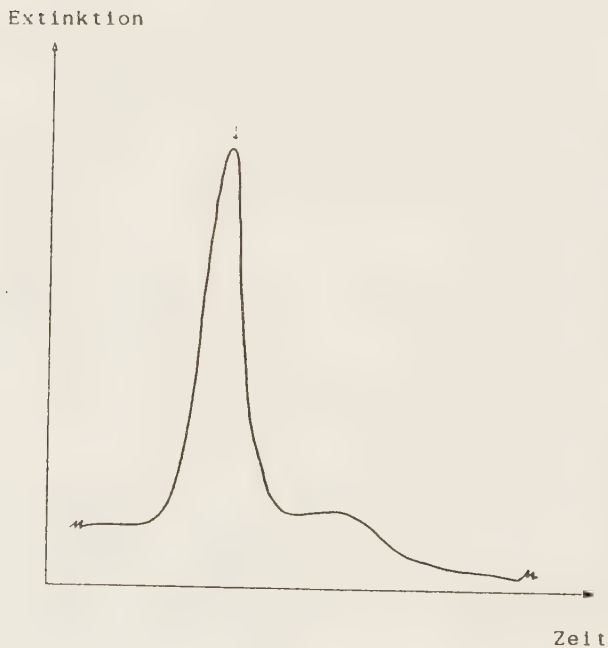


Abb. 6: Peak der delta 8-THC-COOH bei 6,04 Minuten (↑).

Für die Probe wurden 0,5 Mikroliter delta 8-THC-COOH mit 9,5 Mikroliter Methanol gemischt.

Die Wellenlänge des Lichtes betrug 214 nm.

Plotting Factors: 1860.



Eine Ausnahme bildete hier das Spülen mit 20 ml bzw. 10 ml dieser Lösung: der Nachweis war praktisch nicht mehr möglich, die Proben waren allerdings in wesentlich größerem Maße verunreinigt als bei der Benutzung kleinerer Mengen methanolischer Lösung. Auch fanden sich noch störende Einflüsse bei verschiedenen Leerurinen zu

dem Zeitpunkt, an dem der Peak der delta 9-THC-Carbonsäure erscheinen sollte.

Das Spülen der Säule mit 1,0 ml methanolischer Lösung schien den besten Kompromiß zwischen mangelnder Reinigung der Proben und der Nachweisbarkeit der delta 9-THC-Carbonsäure darzustellen. Die Verwendung von Baker-Filterssäulen verbesserte bzw. verschlechterte zwar nicht den Nachweis an der bewußten Stelle, wirkte sich insgesamt jedoch sehr positiv auf den Verschmutzungsgrad der Proben aus.

Insbesondere während der ersten fünf Minuten des Chromatogramms fiel die Absorption wesentlich geringer aus aufgrund der reineren Eluate.

1.12 Die Probenvorbereitung erfolgt ebenso wie Probenaufgabe, Säulenwäsche, Elution und Einengen wie in 1.6 beschrieben. Die Säulenvorbereitung wird leicht modifiziert: Das Konditionieren erfolgt mit zweimal 3,0 ml Methanol und anschließend mit zweimal 3,0 ml Aqua dest.

Ergebnisse: Die Qualität der aufbereiteten Proben und der Nachweis verbesserten bzw. verschlechterten sich zwar nicht, doch lief die hydrolysierte Urinmenge bei unverändertem Vakuum in kürzerer Zeit durch die Säule. Die Zeitersparnis betrug bei den verschiedenen Urinen zwischen zwei und fünf Minuten.

1.13 10 ml Urin werden mit 3,0 ml 10%iger methanolischer KOH versetzt und im Heizblock bei 100°C zwölf Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 5,0 ml Essigsäure zugegeben, so daß sich ein pH von ca. 3,5 einstellt. Nach dem Konditionieren der Säulen mit 2,0 ml Methanol und 2,0 ml Aqua dest. wird die aufbereitete Probe im Vakuum (5"Hg) aufgegeben. Nach dem Durchlauf der Proben werden die Säulen nun auf unterschiedliche Weise gereinigt. Allen gemeinsam ist noch das Spülen der Säule nach dem Durchlaufen der Urinproben mit Je 1,0 ml Aqua dest.,  $\text{NaHCO}_3$ , Aqua dest. und 10%iger methanolischer Lösung.

- 1) Die Baker Säule wird mit 100 Mikroliter Aceton gespült und trockengesaugt.
- 2) Die Baker Säule wird mit 150 Mikroliter Aceton gespült und trockengesaugt.

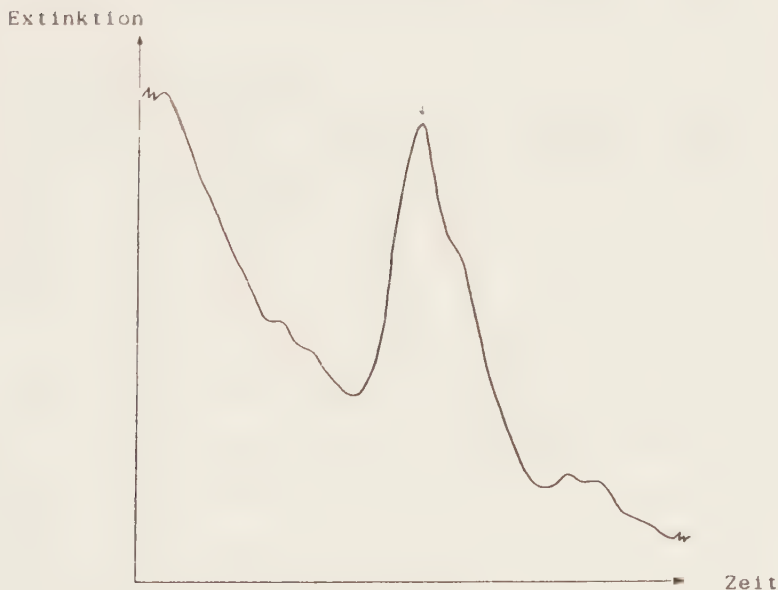
Ergebnisse: Die beiden Versuchsansätze führten zu relativ guten Ergebnissen. Beim Trockensaugen mit 100 Mikroliter Aceton war an der Stelle, wo bei positiven Proben der Peak der delta 9-THC-Carbonsäure auftrat, bei den untersuchten EMIT-negativen Urinen keine störende Überlagerung mehr vorzufinden. Andererseits schien ein ausreichender Nachweis bei EMIT-positiven Urinen gewährleistet.

Verwendete man zum Trockensaugen 150 Mikroliter Aceton (Versuch 2), so galt, was die negativen Urinproben betrifft, dasselbe wie für 100 Mikroliter Aceton. Die stö-

renden Peaks waren ebenfalls beseitigt. Allerdings wurde die  $\delta$  9-THC-Carbonsäure bei positiven Urinen durch das Trockensaugen mit der größeren Acetonmenge mitausgewaschen, so daß dem unter 1) beschriebenen Verfahren der Vorzug zu geben war.

Abb. 7: Chromatogramm zum Versuch 1.13.1.

Der Peak der  $\delta$  9-THC-COOH erschien bei 7,42 Minuten ( ). Die Wellenlänge des Detektors betrug 214 nm. Plotting Factors: 1350



Die Ergebnisse wurden doppelt überprüft. Zum einen waren die EMIT-Kontrollen teilweise wiederholt worden, zum anderen waren von manchen Urinen Doppelproben angefertigt

worden. Der zweite Ansatz diente dann zur dünnschicht-chromatographischen Untersuchung.

1.14 Die Versuchsparameter gleichen denen, wie sie im Versuch 1.13.1) dargelegt wurden. Nur die Säulenwäsche unterscheidet sich dadurch, daß mit 1,0 ml Aqua dest., zweimal 1,0 ml  $\text{NaHCO}_3$  und wieder mit 1,0 ml Aqua dest. gespült wird.

Ergebnisse: Das zweimalige Waschen der Säule mit  $\text{NaHCO}_3$  erbrachte keine verbesserte Reinigung der Probe.

1.15 Die Probe wird folgendermaßen vorbereitet: 10 ml Urin werden mit 2,5 ml 7 N KOH versetzt und daraufhin zwölf Minuten lang bei nur  $50^\circ\text{C}$  erhitzt. Sonst läuft der Versuch ab, wie in 1.13.1) beschrieben worden ist.

Ergebnisse: Diese Art der Hydrolyse des Urins bringt keine Verbesserung, im Gegenteil sogar eine leichte Verschlechterung der Ergebnisse.

1.16 Die Proben werden wie in 1.13 vorbereitet. Nach dem Konditionieren der Säulen mit je zweimal 3,0 ml Methanol und Aqua dest. werden die Proben aufgegeben. Nach deren Durchlauf wird die Säule mit je 1,0 ml Aqua dest.,  $\text{NaHCO}_3$ , 0,1 N HCl und schließlich mit 1,0 ml 10%iger methanolischer Lösung gewaschen. Trockengesaugt wird mit 50 Mikroliter Aceton. Das Eluat, gewonnen durch zweimal

400 Mikroliter Aceton, wird eingeengt, der Rückstand in 1,0 ml Methanol gelöst und ungefähr zehn Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert. Nach nochmaligem Einengen des Überstandes werden 60 Mikroliter Methanol zugegeben. Die Lösung wird kurz am Vortex geschüttelt. In den Chromatographen injiziert man jeweils 10 Mikroliter.

Ergebnisse: Das Spülen der Säule mit 0,1 N HCl (1,0 ml) brachte zwei Nachteile mit sich. Zum einen verschlechterte sich der Nachweis der  $\delta$ 9-THC-Carbonsäure gegenüber anderen Methoden in erheblichem Maße, zum anderen waren die aufbereiteten Proben stark mit Partikeln verunreinigt.

Letzteres machte es nötig, die Eluate nochmals zu zentrifugieren, was jedoch nur zu einer geringen Verbesserung führte.

1.17 Der Urin wird wie in 1.13 aufbereitet und extrahiert, abgesehen von der Säulenwäsche, die folgendermaßen vor sich geht: Zunächst spülen mit 1,0 ml Aqua dest., zweimal 1,0 ml 0,2 N HCl und schließlich mit 100 Mikroliter Aceton trockensaugen.

Ergebnisse: Wie in 1.16 wurden die Proben trotz des Spülens mit 0,2 N HCl nicht sauberer, sondern eher noch stärker verunreinigt. Auch das zusätzliche Spülen der Baker-Säule mit  $\text{NaHCO}_3$  (0,1 ml) brachte keine Verbesserung.

#### 1.18 Hydrolyse des Urins nach Daldrup (modifiziert) (6):

Ausgehend von der Beschreibung, die Daldrup für die Aufbereitung von Blut respektive von Serum angibt (cf. III/4.), wird ein Urinvolumen von 10 ml mit 0,5 ml B-Glucuronidase/Arylsulfatase vermischt. Daraufhin schüttelt man den Inhalt des Glases, nachdem man 3,0 ml Methanol hinzugegeben hat, kurz und inkubiert ihn nach dem Zentrifugieren (3000 upm) 20 Stunden bei 4°C.

Das weitere Procedere unterscheidet sich jedoch von den Angaben des oben erwähnten Autors.

Die Säule wird mit je zweimal 1,0 ml Methanol und Aqua dest. konditioniert. Der abpipettierte Überstand des nach der Lagerung noch einmal zentrifugierten Urins wird auf die Säule gegeben. Nach dem Durchlauf der Probe reinigt man die Säule mit je 1,0 ml Aqua dest.,  $\text{NaHCO}_3$  und Aqua dest.; trockengesaugt wird mit 50 Mikroliter Aceton. Die Elution erfolgt mit zweimal 200 Mikroliter Aceton. Das Eluat wird am Rotavapor bei 50°C eingeeengt und der Rückstand in 60 Mikroliter Methanol aufgenommen. In den Chromatographen werden jeweil 10 Mikroliter der gewonnenen Probe injiziert.

Ergebnisse: Der Nachweis gelang mit dieser Hydrolyseart nur sehr unzureichend. Darüberhinaus befanden sich extrem viele Partikel in dem fertig aufbereiteten Probenvolumen. Aufgrund dieser Tatsache wurde diese Methode nicht mehr weiter verfolgt.

### 1.19 Extraktionsverfahren nach El Sohly (modifiziert) (9):

1.19.1 Probenvorbereitung, Säulenwäsche und Elution erfolgen ebenso wie Probenaufgabe und Säulenkonditionierung nach dem vom Autor beschriebenen Verfahren (cf. III/2). Als Fließmittel dient im Unterschied zu dem von El Sohly angegebenen Vorgehen ein Methanol - Ameisensäure (0,01 M) - Gemisch im Verhältnis 75 : 25. Der Flow beträgt 1,5 ml/min. Außerdem wird eine Bond Elut - Säule für THC-Cannabinoide benützt.

Ergebnisse: Die gewonnenen Proben waren alle ausgesprochen sauber. Allerdings gelang wegen der äußerst geringen Ausbeute der Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure nur sehr schlecht. Einen weiteren Nachteil stellte der relativ hohe Zeitaufwand dar.

1.19.2 Das in Punkt 1.19.1 erläuterte Vorgehen wird übernommen, als Säule dient jedoch eine Bond Elut - Säule - 20H-Diol (614303).

Ergebnisse: Bei Verwendung dieser Säule war die Urinprobe nach 90 Minuten erst zur Hälfte durchgelaufen. Der Versuch wurde daraufhin abgebrochen.

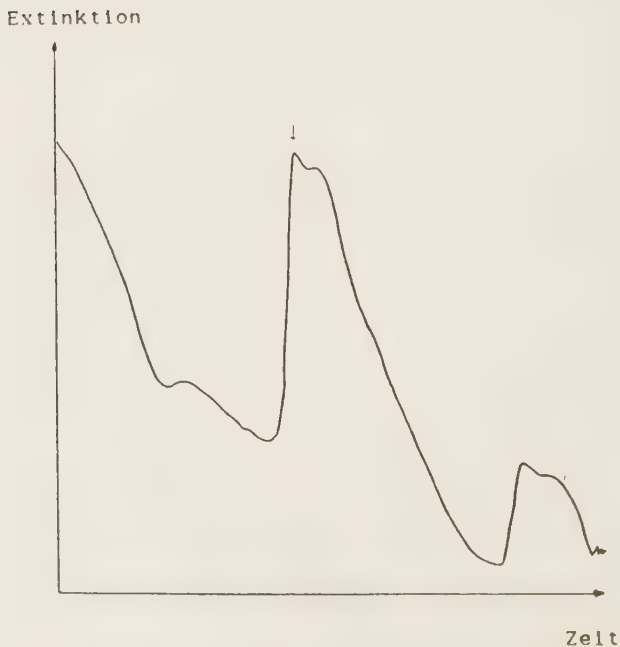
1.19.3 Das modifizierte Verfahren nach El Sohly (cf. 1.19.1) wird auch für Baker Säulen (Baker - 10 SPE™ Octadecyl (C<sub>18</sub>) Disposable Columns: 7020/1) erprobt.

Ergebnisse: Der Nachweis für delta 9-THC-Carbonsäure gelang mit der oben angeführten Baker Säule für einen stark positiven Urin (Nachprüfung mittels EMIT und Dünnschichtchromatographie). Die Peakhöhe war allerdings mäßig ausgeprägt, der aufbereitete Urin wie in 1.19.1 ebenfalls sehr sauber.

Abb. 8: Chromatogramm zum Versuch 1.19.3.

Der Peak der delta 9-THC-Carbonsäure erschien bei 7,27 Minuten (↑). Die Wellenlänge des Lichtes betrug 214 nm.

Plotting Factors: 18130.



1.20 Aufbereitungs- und Extraktionsverfahren nach Willson (modifiziert) (62):

Der Autor entwickelte dieses Verfahren ursprünglich zum Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure mittels Dünnschichtchromatographie. Um die Verwendbarkeit der Versuchsanleitung auch für den HPL-Chromatographen zu überprüfen, wurden einige Urine nach dieser allerdings leicht abgeänderten Beschreibung aufbereitet.

Für die Probenvorbereitung werden 10 ml Urin mit 0,9 ml 10 M NaOH vermischt und für 15 Minuten in kochendem Wasser hydrolysiert. Nach dem Abkühlen der Urinprobe stellt man einen pH von 1 bis 3 ein, indem man ungefähr 0,7 ml konzentrierte HCl hinzugibt.

Die Säulen werden unter Vakuum zweimal mit je 1,0 ml Methanol und darauf mit je 1,0 ml Aqua dest. konditioniert. Der Überstand des zentrifugierten Urins ist auf die Säulen, die vorher nicht trockengesaugt werden sollen, zu pipettieren. Nach dem Durchlaufen des Probenvolumens wäscht man die Säule mit je 1,0 ml Aqua dest.,  $\text{NaHCO}_3$  (5%ig) und wieder mit Aqua dest. Das Trockensaugen der Säule erfolgt mit 50 Mikroliter Aceton. Nun wird das Blech mit den Gläsern eingesetzt und darauf mit 1,0 ml Aceton eluiert.

Dem Eluat werden 0,5 ml Dichlormethan zugegeben. Die Mischung ist anschließend am Vortex zu schütteln und darauf kurz zu zentrifugieren. Die obere Phase wird vorsichtig abpipettiert. Dem Rest fügt man 0,5 ml Hexan

hinzu und schüttelt das Gemisch wiederum am Vortex gut durch. Anschließend wird fünf Minuten lang bei 3500 g zentrifugiert. Die obere Phase ist danach abzupipettieren, wobei danach gemäß den Angaben des Autors nur ein kleiner Wassertropfen am Boden des Reagenzglases zurückbleiben soll. Die entfernte obere Phase ist am Rotavapor bei ca. 60°C einzuengen.

Der Rückstand wird in 60 µl Methanol gelöst - Willson benutzt hierzu 10 Mikroliter Aceton - , wovon jeweils 10 Mikroliter in den Chromatographen gegeben werden.

Ergebnisse: Trotz des sehr aufwendigen Aufbereitungs- und Reinigungsmodus mit mehrmaligem Zentrifugieren waren die endgültigen Proben ausgesprochen stark verschmutzt. Auch erfolgte die deutliche Abtrennung der einzelnen Phasen nicht, wie es vom Autor angegeben wurde. Darüberhinaus konnte der Nachweis der Existenz von delta 9-THC-Carbonsäure nicht erbracht werden.

#### 1.21 Aufbereitung nach "Cannabuse" (modifiziert) (4):

Dieses Verfahren wird eigentlich eingesetzt zum Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure durch dünn-schichtchromatographische Untersuchungen. Ausgehend von den Originalangaben sollte jedoch auch seine Brauchbarkeit für die HPLC untersucht werden, wobei allerdings in einigen wenigen Punkten von der ursprünglichen Verfahrensweise abgewichen wurde.

1.21.1 Für die Probenvorbereitung werden 2,0 ml (bzw. 5,0 ml) Urin und 0,4 ml (1,0 ml) 7 N KOH bei 100°C zwölf Minuten lang erhitzt. Nach dem Abkühlen gibt man 0,4 ml (1,0 ml) Essigsäure zu. Die Säulenkonditionierung erfolgt mit zweimal 1,0 ml Methanol und zweimal 1,0 ml Aqua dest. Dabei soll die Säule nicht trockengesaugt werden. Die Säulenwäsche und die Elution erfolgen genau wie im Punkt 1.1 angegeben. Das Eluat wird eingengt, der Rückstand in 60 Mikroliter Methanol gelöst. In den Chromatographen werden jeweils 10 ml der Probe eingespritzt.

Ergebnisse: Beide Ansätze - sowohl mit 5,0 ml als auch 2,0 ml Urin - zeichneten sich durch eine sehr hohe Absorption im Verlaufe der ersten vier Minuten des Chromatogramms aus. Der Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure gelang nur in sehr beschränktem Maße bei 5,0 ml Ausgangsvolumen. Mit 2,0 ml Urinvolumen konnte kein brauchbares Resultat erzielt werden.

1.21.2 Statt 7 N KOH wird 10%ige methanolische KOH (0,5 ml bei 2,0 ml Urinvolumen) benutzt und für zwölf bzw. acht Minuten erhitzt. Anschließend werden 0,8 ml Essigsäure hinzupipettiert.

Die restlichen Punkte werden vom Versuch 1.21.1 übernommen.

Ergebnisse: Die Proben sind zwar etwas sauberer als die in 1.21.1, doch wird der Nachweis für die delta 9-THC-

COOH nicht verbessert. Auch die Variation der Erhitzungsdauer (zwölf oder acht Minuten) bringt im Vergleich keine Unterschiede.

1.21.3 Die Probenvorbereitung entspricht der in 1.21.2 beschriebenen Art mit einer Erhitzungsdauer von zwölf Minuten. Auch die anderen Punkte gleichen denen im vorhergehenden Versuch mit Ausnahme der Säulenwäsche. Diese erfolgt mit je 1,0 ml  $\text{NaHCO}_3$  und Aqua dest. und wird anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen an methanolischer Lösung (je 1,0 ml 5%, 10%, 20%, 30%) bzw. ohne methanolische Lösung gespült.

Ergebnisse: Die besseren Resultate werden erzielt, wenn die Säulenwäsche entweder ganz ohne methanolische Lösung oder mit 10%iger methanolischer Lösung (in Aqua dest.) erfolgt.

Die Qualität des Nachweises von delta 9-THC-Carbonsäure ist jedoch gegenüber den vorhergehenden Methoden (1.21.1 und 1.21.2) nicht verbessert.

1.22 Neben der Extraktion mit Hilfe von Säulen der Firma Baker sollte auch noch die Brauchbarkeit von XAD 2-Säulen für den Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure überprüft werden.

Die Hilfsmittel hierfür unterscheiden sich nur in wenigen Punkten von den anfangs aufgeführten Materialien.

Zusätzlich werden benötigt:

- Amberlite XAD 2-Säulen;
- Ammoniaklösung;
- 0,2 M Acetat-Puffer (pH 4) mit 7%igem Isopropanol.

Das Aufbereitungs- und Extraktionsverfahren unterscheidet sich erheblich von den bisher erwähnten Methoden, führt aber nach Untersuchungen im Hause zu guten Ergebnissen bei der Analyse mittels Dünnschichtchromatographie.

1.22.1 Für die Probenvorbereitung werden 10 ml Urin und 3,0 ml methanolische KOH vermischt und zwölf Minuten lang bei 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen gibt man 5,0 ml Eisessig hinzu, so daß sich ein pH von ca. 3,5 einstellt. Zur Säulenvorbereitung entfernt man aus den Amberlite XAD 2-Säulen vorsichtig die oberste Watterschicht. Die zwei zurückbleibenden Filterchen werden mit dem dicken Ende einer Pasteurpipette fest nach unten gedrückt. Die Probe gibt man auf, indem man in die vorbereitete Säule 5,0 ml Acetat-Puffer pipettiert und anschließend den Urin aufgibt. Dazu benützt man am besten ein vorher auf der Säule mittels eines Adapters befestigtes Reservoir. Das Vakuum, das jetzt erst angelegt wird, soll auf ca. 5" Hg eingestellt werden. Nach dem Durchlaufen des Puffer-Urin-Gemisches, was 15 Minuten und mehr beanspruchen kann, wird die Säule nacheinander mit folgenden Substanzen bei einem Vakuum von

5" Hg gespült: 10 ml Aqua dest., 10 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (5%ig), 10 ml Aqua dest., 20 ml 50%ige methanolische Lösung.

Das Vakuum wird jetzt ausgeschaltet. Man pipettiert 100 Mikroliter Aceton auf die Säule, legt das Vakuum wieder an (ca. 15" Hg) und saugt die Säule mindestens fünf Minuten trocken. Zur Elution sind die Stahlnadeln mit Zellstoff zu säubern, das Gestell mit den Gläsern wird eingesetzt. Eluiert wird mit zweimal 850 Mikroliter Aceton. Anschließend wird das Eluat bei ca. 50°C am Rotavapor eingengt. Den Rückstand nimmt man in 60 Mikroliter Methanol auf.

In den Chromatographen werden jeweils 10 Mikroliter injiziert.

Ergebnisse: Diese relativ aufwendige Aufbereitungsmethode, die für den Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure durch Dünnschichtchromatographie gebraucht wird, brachte neben dem großen Zeitbedarf (etwa zwei Stunden) auch noch andere Nachteile für die HPLC mit sich. Zum einen gelang der Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure wesentlich schlechter als mit anderen bereits angesprochenen Methoden (cf. 1.13), zum anderen waren die Proben ausgesprochen stark mit korpuskulären Bestandteilen verunreinigt. Dies ließ die Brauchbarkeit dieser Aufbereitungsart für die HPLC ungeachtet der Nachweisgrenzen ohnehin fragwürdig erscheinen. Das körnige Trägerma-

terial der Amberlite XAD 2-Säulen wurde bei der Elution teilweise mit ausgewaschen. Auch anschließendes Zentrifugieren führte nur zu einer unvollständigen Entfernung der Partikel.

Die Chromatogramme besaßen bis ungefähr zur sechsten Minute keine Aussagekraft, da die Absorption viel zu hoch war. Erst kurz vor dem Zeitpunkt, zu dem die delta 9-THC-Carbonsäure auf dem Chromatogramm erschien, begann sie abzusinken. Wegen der erwähnten Nachteile wurde diese Methode nicht mehr weiter verfolgt.

1.22.2 Das vorher beschriebene Extraktionsschema wird in allen Einzelheiten übernommen. Nur wird anstatt der Amberlite XAD 2-Säulen Material der Firma Baker verwendet (Baker-10-SPE<sup>TM</sup> Octadecyl (C<sub>18</sub>) Disposable Columns), um die Anwendung dieser Aufbereitungsmethode auch hierfür zu überprüfen.

Ergebnisse: Der Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure mit den Baker Säulen mißlang völlig. Die Säule wurde durch die ausgiebige Reinigung nach der Probenaufgabe vollkommen "leergewaschen", so daß die Chromatogramme keinerlei Aussagekraft mehr hatten.

## 2. ÜBERPRÜFUNG DER ERGEBNISSE

2.1 Mit Hilfe synthetisierter 11-Nor-9-Carboxy-delta 8-THC-Carbonsäure, die entweder zu 10 Mikroliter Methanol oder auch zu Urinleerproben gegeben wurde, gelang die eindeutige Festlegung des Zeitpunktes, zu dem die delta 8-THC-Carbonsäure im Chromatogramm erscheinen sollte.

Es zeigte sich bei der Aufbereitung von Urinen, die bei anderen Untersuchungsmethoden als eindeutig positiv erkannt wurden, daß im Chromatogramm der Peak der 11-Nor-9-Carboxy-delta 9-THC-Carbonsäure ungefähr 30 Sekunden später erschien als der der artifiziell hergestellten delta 8-THC-Carbonsäure. Die Existenz von delta 8-THC-Carbonsäure war jedoch im Regelfall bei den untersuchten Urinen nicht nachzuweisen, mit Ausnahme einiger weniger sehr stark THC-positiver Proben. Grund hierfür dürfte die geringe Konzentration von delta 8-THC im Haschisch sein (cf. 11/ ). Die Höhe dieses delta 8-THC-Peaks fiel allerdings immer deutlich geringer aus als im Falle der delta 9-THC-Carbonsäure.

2.2 Die Resultate, die man durch die HPLC erzielt hatte, wurden außerdem durch eine Kombination verschiedener Untersuchungen überprüft.

### 2.2.1 EMIT d.a.u.:

Die Urinproben wurden grundsätzlich vor oder nach der

Analyse mittels HPLC auch durch EMIT verifiziert. Es stellte sich dabei heraus, daß Proben, die in der Gegend des Medium-Calibrators lagen, in den weitaus meisten Fällen ebenfalls problemlos durch die HPLC nachgewiesen werden können. Urine, die im Bereich des Low-Calibrators angesiedelt sind, führten in manchen Grenzfällen zu einem mangelhaften beziehungsweise fehlenden Nachweis in der HPLC.

Darüberhinaus wurden während der Untersuchung der aufbereiteten Urinproben durch HPLC teilweise Fraktionen angefertigt, die anschließend am Rotavapor eingeengt wurden. Die Rückstände wurden jeweils in 100 Mikroliter Methanol gelöst und darauf durch EMIT überprüft. Fraktioniert wurde zu dem Zeitpunkt, an dem die delta 9-THC-Carbonsäure erschien, aber auch an anderen Stellen, um über eine Kontrollmöglichkeit zu verfügen.

#### 2.2.2. Dünnschichtchromatographie (TLC):

Bei der Aufbereitung und Extraktion der Urinproben wurden Doppelansätze hergestellt. Die gewonnenen Eluate waren für die HPLC nochmals einzuengen und in 60 Mikroliter Methanol zu lösen. Für die Dünnschichtchromatographie jedoch wurden sie mit Hilfe von Kieselgur-Spitzen direkt auf die Platte gegeben, die auf dem TLC-Spotter durch Erhitzen bereits eine Temperatur von ca. 90°C erreicht hatte.

Als Fließmittel diente eine Mischung aus Chloroform:

Methanol: Ammoniaklösung im Verhältnis 70 : 30 : 2.  
Die Detektion erfolgte mit Echtblausalz RR (0,3) in  
Methanol : H<sub>2</sub>O (50 : 50).

Die charakteristische Anfärbung (37) trat bei rf 3.3  
auf.

### 2.2.3 TLC und HPLC:

Drei Ansätze desselben Urins wurden hergestellt. Einer  
fand Verwendung für die HPLC, die zwei anderen Proben  
wurden für die Dünnschichtchromatographie vorbereitet.  
Die beiden Eluate für die TLC brachte man nebeneinander  
auf der Dünnschichtplatte auf. Die Detektion hatte so zu  
erfolgen, daß man die eine Probe mit einem Stück Papier  
abdeckte, während die andere Probe mit Echtblausalz an-  
gefärbt wurde. Man kennzeichnete sich neben der unge-  
färbten Probe die Stelle, die auf der gefärbten als die  
für Cannabinoide charakteristische erkannt wurde.

Das Trägermaterial der Dünnschichtplatte wurde nun bei  
der ungefärbten Probe an der besagten Stelle vorsichtig  
abgeschabt und in ein Reagenzglas gegeben. Man pi-  
pettierte 2,0 ml Methanol hinzu und lagerte das Glas für  
einige Stunden im Kühlschrank. Anschließend wurde es für  
zehn Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand  
war vorsichtig abzupipettieren und am Rotavapor bei 50°C  
einzuziehen. Der Rückstand wurde in 60 Mikroliter  
Methanol gelöst, wovon Jeweils zehn Mikroliter in den  
Chromatographen gegeben werden konnten.

Bei korrekter Arbeitsweise ließ sich einwandfrei nachweisen, daß das Extrakt der Stelle, die auf der Dünnschichtplatte als THC-spezifisch nachgewiesen wurde, im HPL-Chromatogramm übereinstimmte mit der Probe, die man zum Vergleich direkt für die HPLC angefertigt hatte. Die entsprechenden Peaks traten bei beiden Proben, das heißt dem "TLC-Extrakt" und dem nur für die HPLC hergestellten Eluat genau an der gleichen Stelle auf.

### 3. KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN

Zur Ermittlung einer ungefähren Relation zwischen Peakhöhe und Konzentration des Haschischmetaboliten im Urin wurde ein Cannabinoid-Kontrollurin (Syva) benutzt, der eine Konzentration von 400 Nanogramm delta 8-THC-Carbonsäure pro Milliliter besaß. Pipettierte man 0,5 ml dieses Cannabinoid-Controllers zu 9,5 ml Leerurin, so ergab sich insgesamt eine Konzentration von 20 Nanogramm pro Milliliter. Die Probe wurde anschließend aufbereitet und nach dem in 1.13.1 beschriebenen Verfahren extrahiert.

Dasselbe wiederholte man mit einer neuen Probe, wobei eine Konzentration von 10 Nanogramm delta 8-THC-Carbonsäure pro Milliliter eingestellt wurde.

Als Ergebnis ließ sich folgendes festhalten: Die durchschnittliche Peakhöhe bei 20 Nanogramm delta 8-THC-Carbonsäure pro Milliliter betrug 21,0, bei einer Konzentration von 10 ng/ml ungefähr 12,0. Aufgrund der begrenzten Menge an Cannabinoid-Kontrollurin konnten nur Proben mit diesen zwei

verschiedenen Konzentrationen hergestellt werden.

Abb. 9: Chromatogramm zum Abschnitt IV/3.

Bei der hier verwendeten Urinprobe handelte es sich um "THC-negatives" Untersuchungsmaterial. Dies wurde vorher durch EMIT- und TLC-Überprüfungen verifiziert.

Wellenlänge: 214 nm.

Plotting Factors: 3060.

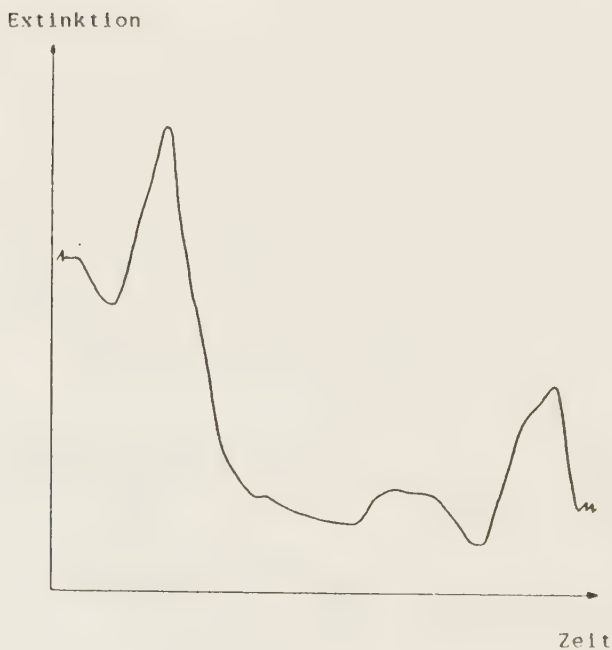


Abb. 10: Chromatogramm zum Abschnitt IV/3.

Es wurde dieselbe "THC-negative" Urinprobe wie in Abbildung 9 benützt. Allerdings wurde sie mit artifizieller delta 8-THC-Carbonsäure so versetzt, daß sich eine Konzentration von 20 ng pro Milliliter ergab.

Der Peak der delta 8-THC-Carbonsäure erschien bei 7,11 Minuten (↑).

Wellenlänge des Lichtes: 214 nm.

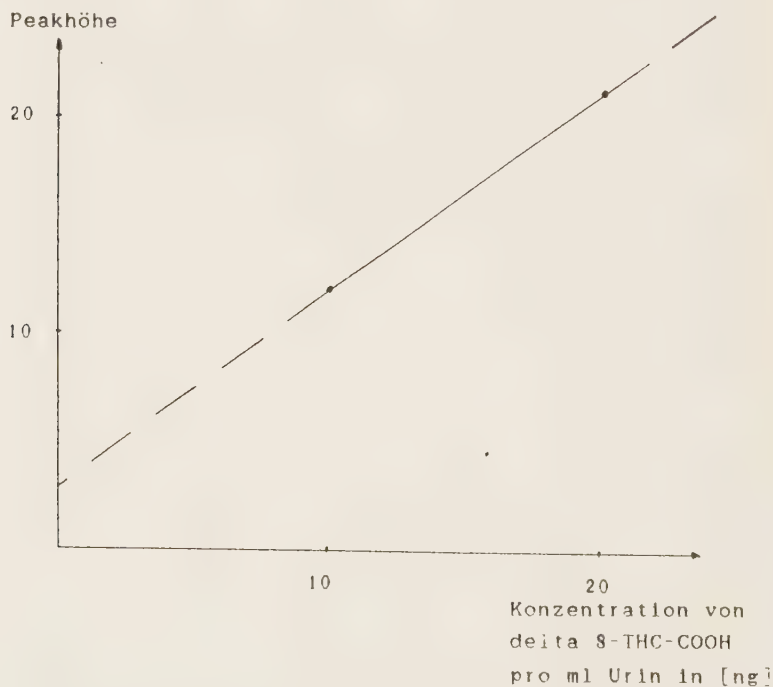
Plotting Factors: 3700.



Durch die Verbindung der ermittelten Werte ließ sich eine lineare Beziehung zwischen der Peakhöhe und der Konzentration an delta 8-THC-Carbonsäure im Urin herstellen.

Meßergebnisse:

Abb. 11:



Der Aussagewert dieser Geraden darf wegen der geringen Anzahl an Meßpunkten jedoch nicht überbewertet werden. Hierzu sind ausgedehntere Untersuchungen mit wesentlich mehr Meßpunkten, das heißt verschiedenen Konzentrationen nötig.

## V. Diskussion

Von den bereits erläuterten verschiedenen Verfahrensweisen zur Aufbereitung des Urins und der Extraktion der delta 9-THC-Carbonsäure kristallisieren sich drei Methoden als beste heraus.

Hierbei handelt es sich erstens um das von El Sohly (9) angegebene, leicht modifizierte Verfahren (IV/1.19.3). Die aufbereiteten Proben sind - besonders im Vergleich zu den durch andere Aufbereitungsmethoden gewonnenen Ergebnissen - alle ausgesprochen sauber. Diese positive Tatsache führt zu einer wesentlich geringeren Belastung der Chromatographiesäule als beispielsweise die im folgenden beschriebenen Verfahren. Auffallend ist dabei, daß mit einer "normalen" Baker Säule (Baker-10 SPET<sup>TM</sup> Octadecyl (C<sub>18</sub>) Disposable Columns) bessere Ergebnisse erzielt werden als mit den von El Sohly empfohlenen Bond Elut-Säulen für THC-Cannabinoide. Einen wohl gravierenden Nachteil dieser Aufbereitungsart stellt der hohe Zeitaufwand dar, der hauptsächlich durch das Waschen der Säule mit 10 ml 0,1 M HCl und 25 ml Acetonitril : 50 mM Phosphorsäure (1 : 9) verursacht wird. Weiterhin ist zu bemerken, daß die HPLC-Chromatogramme der Urinproben, die von El Sohly veröffentlicht wurden, ein anderes Aussehen besitzen als die in den eigenen Versuchen erzielten Protokolle. Auch sind El Sohly's Ergebnisse wesentlich eindeutiger. Der Peak der delta 9-THC-Carbonsäure erscheint bei El Sohly nach 4,5 Minuten, bei den eigenen Chromatogrammen

Jedoch bei ca. 7,5 Minuten. Darüberhinaus gelingt der Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure mit diesem Verfahren in den durchgeführten Versuchen nur bei Urinen mit relativ hohen Konzentrationen an dieser Substanz.

Des weiteren stellen sich zwei andere erprobte verschiedene Verfahren als akzeptabelste dar, nämlich die in den Punkten I.13.1 bzw. I.10 dargelegten Varianten. Die unter IV/I.13.1 beschriebene Methode - sie läuft mit 10 ml Urin Ausgangsvolumen ab - wurde für die meisten Urinproben (ca. 35 Stück) durchgeführt. Hier konnte in einem Großteil der Fälle ein befriedigender Nachweis erzielt werden. Als größter Vorteil, besonders gegenüber der von El Sohly angegebenen Methode, fallen die relativ kurze Aufbereitungszeit und die niedrige Nachweisgrenze für die delta 9-THC-Carbonsäure ins Gewicht. Allerdings existieren immer noch größere Schwierigkeiten mit einigen "Problemurinen". So gibt es bei Proben, die sehr stark mit Partikeln angereichert sind, Überlagerungen im Chromatogramm, die in einigen wenigen Fällen zu einem Ergebnis führen können, das man fälschlicherweise als positiv interpretiert. Dies führt natürlich zu einer Abwertung der Brauchbarkeit dieser Methode.

Außerdem ergeben sich Unzulänglichkeiten dieser Methode - genauso wie bei der von El Sohly angegebenen Aufbereitungsart - bei der Analyse von sogenannten "GS-Urinen", die Leichen entnommen werden. Dazu ist allerdings anzumerken, daß solche Probleme aber auch bei der Untersuchung dieser

Urine mit Dunnschichtchromatographie und EMIT auftreten können. Von drei untersuchten Proben dieser Kategorie stimmten beispielsweise die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden nur in einem einzigen Fall überein. Noch weitergehende Reinigungsmaßnahmen zur Verbesserung der Ergebnisse führen zu Resultaten, die ebenfalls nicht akzeptabel sind. Die verstärkte Reinigung der Säule mit größeren Mengen an methanolischer Lösung führt zum Beispiel sogar zu einer erhöhten Konzentration von Partikeln in der fertig aufbereiteten Probe (cf. 1.11). Außerdem sinkt die Nachweisbarkeit der  $\delta^9$  THC-Carbonsäure mit der Intensität der Reinigungsmaßnahmen. Ebenso wie die Spülung der Säulen mit relativ großen Mengen an Methanol bzw. methanolischer Lösung führt die Verwendung von Salzsäure (0,1 oder 0,2 N HCl) nicht zu der gewünschten Reinigung der Proben, sondern im Gegenteil zu einer noch stärkeren Anreicherung mit Partikeln (cf. 1.16 und 1.17).

Eine Ausnahme bildet in diesem Punkt jedoch das modifizierte Verfahren nach El Sohly (1.19.3), das bei der Verwendung von 10 ml 0,1 N HCl zu durchwegs sauberen Proben führt. Der Autor spült allerdings noch mit 25 ml Puffer nach, was eine Erklärung dafür abgeben könnte.

In den eigenen Versuchen wurde die große Reinheit der Proben aber mit einem wesentlich schlechteren Nachweis für die  $\delta^9$  THC-Carbonsäure erkaufft.

Als dritte geeignete Methode, die in IV/1.10 beschrieben

wird, erscheint die Messung mit Licht der Wellenlänge 229 Nanometer. Alle anderen Versuche wurden sonst bei 214 Nanometer durchgeführt. Außerdem wurden für die Probenaufbereitung nur 5,0 ml Urin benutzt.

Die gewonnenen Proben waren alle relativ sauber und somit auch von diesem Gesichtspunkt her brauchbar für die HPLC. Bei den mit dieser Art aufbereiteten Urinen - insgesamt zehn an der Zahl - sind bei der Untersuchung nur Ergebnisse aufgetreten, die mit EMIT und Dünnschichtchromatographie in Einklang standen. Die Absorption bei 229 nm ist wesentlich spezifischer als bei 214 nm, was die verbesserte Nachweisbarkeit der delta 9-THC-Carbonsäure erklären könnte. Dafür spricht auch die Tatsache, daß bei der Wiederholung dieser Aufbereitungs- und Extraktionsart mit 214 nm wieder falsch positive Ergebnisse auftreten. Schließlich absorbiert bei 194 nm sogar schon Wasser.

Gerade in diesem Zusammenhang gilt es die Ergebnisse von Abbott und Berg (1) zu beachten. Nach ihren Untersuchungen ist die Absorption der delta 9-THC-Carbonsäure bei 280 nm wesentlich geringer als bei 214 nm. Der Extinktionskoeffizient der delta 9-THC-COOH soll diesen Angaben zufolge bei 215 nm ca. zwanzigmal größer sein als bei 280 nm. Daraus kann man folgern, daß zwar die delta 9-THC-COOH auch bei 229 nm eine geringere Absorption aufweist als bei 214 nm, andererseits aber auch störende Einflüsse unerwünschter Substanzen durch die größere "Spezifität" des Lichts dieser Wellenlänge beseitigt werden könnten. Dadurch würden also

weitere Reinigungsmaßnahmen, die nötig wären, um die erwähnten nicht erwünschten Bestandteile des Eluats zu eliminieren, die aber gleichzeitig eine Erhöhung der Nachweis-schwelle zur Folge hätten, überflüssig.

Die Versuche, bei denen die Hydrolyse des Urins mit Hilfe von  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase ablief (cf. 1.18), führten durchwegs zu sehr schlechten bzw. gar keinen Resultaten, weil die Proben alle in einem solchen Ausmaß verschmutzt waren, daß sie zum Teil nicht für die Analyse mittels HPLC verwendet werden konnten. Wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, verbesserte auch ausgiebiges Zentrifugieren die Qualität der Proben kaum, so daß diese Verfahren nach den hier gemachten Erfahrungen als unbrauchbar für die HPLC eingestuft werden können.

Dasselbe gilt auch für die Ergebnisse, die bei der Aufbereitung der Proben unter Verwendung von XAD 2-Säulen (cf. 1.22) erzielt wurden.

Die modifizierte Methode nach "Cannabuse" lieferte ebenfalls keine brauchbaren Resultate für die HPLC.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden verschiedene Methoden zum Nachweis der delta 9-THC-Carbonsäure im Urin mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht.

Ziel der experimentellen Arbeiten war es, ein möglichst sicheres Verfahren mit geeigneter Nachweisgrenze zu entwickeln. Dies gelang nur zum Teil.

Schwierigkeiten ergaben sich vor allem bei der Untersuchung von Urinproben, die Leichen entnommen wurden, und bei solchen, die stark verunreinigt waren.

Als beste Nachweisarten erwiesen sich die unter folgenden Punkten beschriebenen Methoden: Versuch IV/1.11; Versuch IV/1.13.1; Versuch IV/1.19.3.

Die meisten Urine (35 Proben) wurden dabei nach dem in 1.13.1 entwickelten Verfahren untersucht. Die Nachweisgrenze für die delta 9 THC-Carbonsäure lag dabei zwischen 5 und 10 Nanogramm. Zwei Urinproben erzielten, im Gegensatz zu ihrer Untersuchung mittels EMIT und Dünnschichtchromatographie, ein positives Testergebnis.

Für die anderen beiden Verfahren - 1.10 (Messung mit Licht der Wellenlänge 229 nm) und 1.19.3 (Verfahren nach El Sohly) - ergaben sich brauchbare Ergebnisse. Die Nachweisgrenze lag hierbei jedoch wesentlich höher.

## VII. Bibliographische Angaben

- (1) Abbott S. R., Berg I. R., HPLC Analysis of delta-9-Tetrahydrocannabinol and Metabolites in Biological Fluids, reprinted from Symposium Series No 98, Editor, 1979.
- (2) Babor T. H., Rossi A. M., Sagotsky G., Meyer R. E., Group Behavior Patterns of Smoking, pp 47-59, 1974 in (36).
- (3) Binder M. A., Haschisch und Marihuana, in: Deutsches Ärzteblatt, 1981, Heft 4, S. 117-125.
- (4) Biochemical Diagnostics, Cannabuse™.
- (5) Dachis C. A., Pottash A. L. C., Annitto W., Gold M. S., Persistence of urinary marijuana levels after supervised abstinence, Am. J. Psychiatry, 139, pp 1196-1198, 1982.
- (6) Daldrop T., Eine Möglichkeit des Nachweises cannabinoider und sonstiger verkehrsmedizinisch relevanter Fremdstoffen in geringen Mengen Blut, in: Beiträge gerichtl. Med. (38), S. 65-69, 1980.
- (7) Daldrop T., Zur Bewertung der THC- bzw. THC-Metabolitenspiegel im Blut und Urin, in Symposium Forensische Probleme des Drogenmißbrauchs,

Mosbach 1985.

- (8) Delaurentis M. J., McNeill K., Mann A.J., Clark S.,  
Greenwood H. M., An EMIT essay for cannabinoid  
metabolites in urine. in: NIDA Research Monograph 32 (R.L. Hawks, ed.), pp 69-84, 1982.
- (9) El Sohly M. A., El Sohly H. N., Jones A. B., Analysis  
of the Major Metabolite of delta-9-Tetrahydrocannabinol in Urine. II. A HPLC Procedure, in: Journal of Analytical Toxicology, Vol. 7, 1983, S. 262-264.
- (10) Emit-d.a.u., Cannabinoid Urine Assay, Syva, Palo Alto,  
Californien, 1982.
- (11) Forth W. et al., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Mannheim 1975.
- (12) Fried P. A., Behavioral and electroencephalographic correlates of the chronic use of marijuana - a review, Bull. Narc. 29 (2): pp 29-34, 1977.
- (13) Hai H., Das definitive deutsche Hanfhandbuch - Der grüne Zweig, 73, Pleper W. (Hrsg.), Löhrbach 1981.
- (14) Halldin M. M., Anderson L., Widman W., Hollister L. E., Further urinary metabolites of delta-tetrahydrocannabinol in man, Arzneim.

Forsch./Drug Res., 32, pp 1135-1138, 1982.

- (15) Halldin M. M., Carlsson S., Kanter S. L., et al., Urinary metabolites of delta-1-tetrahydrocannabinol in man, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 32, pp 764-768, 1982.
- (16) Heath R. G., Fitzjarrell A. T., Garey R. E., Myers W. A., Chronic marijuana smoking: Its effects on function and structure of the primate brain, in: Nahas G.-G., Paton W. D. M. (eds.), *Marijuana: Biological effects*, New York, Pergamon Press, pp 713-730, 1979.
- (17) Hollister L. E., Richards R. K., Gillespie H. K., Comparison of tetrahydrocannabinol and synhexyl in man, *Clin. Pharm. Therap.* 9, S. 783-791, 1968.
- (18) Huber G. L., Simmons G. A., McCarthy C. R., Cutting M. B., Laguarda R., Pereira W., Depressant effect of marihuana smoke on antibacterial activity of pulmonary alveolar macrophages, *Chest.* 68, S. 769-773, 1975.
- (19) Isbell H., Gorodetzky D., Jasinski D., Claussen V., Spulale F., Korte F., Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in man, *Psychopharmacologia* 1, S. 184-188, 1967.

- (20) Janowsky D. S., Meacham M. P., Blaine J. D., Schorr M., Bozetti L. P., Marihuana effects on simulated flying ability, *Am. J. Psychiatry*, 133 (4), pp 383-388, 1976.
- (21) Johnson S., Domino E. F., Some cardiovascular effects of marihuana smoking in normal volunteers, *Therapeutics*, 12, pp 762-768, 1971.
- (22) Jones R. T., Benowitz N., The 30-day trip - Clinical studies of cannabis tolerance and dependence. In: Braude M. C., Szara S. (eds.), *Pharmacology of Marihuana*, New York: Raven Press, pp 627-642, 1976.
- (23) Kanter S. L., Hollister L. E., Musumeci M., Marijuana metabolites in urine of man, X. Identification of marijuana use by detection of delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid by thin layer chromatography, *J. Chromatogr.*, 234, pp 201-208, 1982.
- (24) Kanter S. L., Hollister L. E., Zamorra J. K., Marijuana metabolites in urine of man, XI. Detection of unconjugated delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid by thin layer chromatography, *J. Chromatogr.*, 235, S. 507-512, 1982.

- (25) Karler R., Toxicological and pharmacological effects (of marijuana), in: Petersen R. C. (ed.), NIDA Research Monograph 14, Marihuana Research Findings, 1976; Washington D.C.: US Government Printing Office, Stock No 017-024-00622-0, pp 55-66, 1977.
- (26) Klonoff H., Effects of marihuana on driving in a restricted area and on city streets: Driving performance and physiological changes, in: Miller L. L. (ed.), Marihuana: effects on Human Behavior, New York, Academic Press, pp 359-397, 1974.
- (27) Klonoff H., Marihuana and driving in real live situations. Science, 185, pp 317-324, 1974.
- (28) Law B., Mason P. A. et al., Confirmation of cannabis use by the analysis of delta-9-tetrahydrocannabinol metabolites in blood and urine by combined HPLC and RIA, in: J. anal. Toxicol., 8, pp 19-22, 1984.
- (29) Law B., Mason P. A. et al., Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin, J. Pharm. Pharmacol., 36, pp 289-294, 1984.
- (30) Law B., Pocock K., Moffat A. C., An evaluation of a

homogeneous enzyme immunoassay (EMIT) for cannabinoid detection in biological fluids, in: J. Forensic Sci. Soc., 22, pp 275-281, 1982.

- (31) Law B., Pocock K., Moffat A. C., The routine detection of cannabinoids in blood by RIA and combined HPLC/RIA, HOCRE Report Nr. 388.
- (32) Law B., Williams P. L., Moffat A. C., The detection and quantification of cannabinoids in blood and urine by RIA, HPLC/RIA and GC/MS, in: Veterinary and Human Toxicology Vol. 21, Supplement, pp 144-147, 1979.
- (33) Machata G., Kryspin-Exner K., Nachweis von Haschisch im Harn nach experimenteller Einnahme, in: Wiener Klinische Wochenzeitschrift, 82. Jahrgang, Nr. 47, S. 849, 1970 (Sonderdruck).
- (34) Manno J., Kipflinger G. F., Haine S. E., Bennett J. F., Forney R. B., Comparative effects of smoking marijuana of placebo on human motor and mental performance, Clin. Pharmacol. Ther., 11, pp 808-815, 1970.
- (35) Marihuana and Health, 8th Annual Report to the U.S. Congress from the Secretary of Health, Education and Welfare, 1980.

- (36) Mendelson J. H., The use of marihuana, Plenum Press, New York, 1974.
- (37) v. Meyer L., Schnelle Voranreicherung und Analyse von Tetrahydrocannabinol (Carbonsäure) aus Urin mit dem Baker-10-Extraktionssystem und Baker SPE Trennsäulen, Baker Application Note 103, 1984.
- (38) Meyer R. E., Psychiatric consequences of marihuana use: the state of evidence, in: Trinklenberg J. R. (ed.), Marihuana and health hazards: Methodologic issues in current research, New York, Academic Press, pp 133- 152, 1975.
- (39) Moskowitz H., McGlothlin W., Hulbert S., The effects of marihuana dosage on driver performance, Contract No DOT-HS-150-2-236; University of California, Los Angeles, Cal., 1973.
- (40) Nowlan R., Cohen S., Tolerance to marihuana: heart rate and subjectiv "high", Clin. Pharmacol. Ther., 22 (5), pp 550 555, 1977.
- (41) Ohlsson A., Lindgren J. E., Wahlen A., Agurell S., Hollister L. E., Gillespie H. K., Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking, in: Clini-

cal Pharmacology and Therapeutics, Vol 28,  
pp 409-416, 1980.

- (42) Peat M. A., Deyman M. E., Johnson J. R., High performance liquid chromatography-immunoassay of delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites in urine, in: Journal of Forensic Science, January 1984.
- (43) Peat M. A., Finkle B. S., Deyman M. E., Laboratory evaluation of immunoassay kits for the detection of cannabinoids in biological fluids, in: NIDA Research Monograph 42 (R. L. Hawks, ed.), pp 85-98, 1982.
- (44) Pivik R. T., Zarcone V., Dement W. C., Hollister L. E., Delta-9-tetrahydrocannabinol and synhexal: effects on human sleeping patterns, Clin. Pharm. Therap. 3, pp 426-435, 1972.
- (45) Prakash R., Aronow W. S., Effects of marijuana in coronary disease. Reply, Clin. Pharmacol. Ther. 19 (1), pp 94-95, 1976.
- (46) Pschyrembel W., Klinisches Wörterbuch, Berlin, New York, de Gruyter, 1986.
- (47) Rebscher E., in: Cannabis heute (Hrsg. W. Feuerlein), Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden, S. 120, 1980.

- (48) Riebelmann B., Nachweis von Cannabis-Inhaltsstoffen im  
Urin, in: Deutsche Apotheker Zeitung, 121.  
Jahrg., Nr. 39, S. 2078-2081, 1981.
- (49) Rodgers R., Crowl C. P., et al., Homogenous enzyme im-  
munoassay for cannabinoids in urine, Clin.  
Chem. 24, pp 95-100, 1978.
- (50) Rodin E., Domino E., Porzak J., The marijuana induced  
social high - neurological and electroence-  
phalographic concomitants, J.A.M.A., 213, pp  
1300-1302, 1970
- (51) Roesner H. U., Nachweis von 11-Nor-delta-9-Tetrahydro-  
cannabinol-9-Carbonsäure in Urin und Serum  
durch EMIT-Single-Test, DC, HPLC und GS-MS-  
SIM, Tischvorlage, 1984.
- (52) Salaschek M., Matte A., Seifert R., Über die Problema-  
tik des Nachweises von Haschischgenuß durch  
dünnschichtchromatographische Untersuchen-  
gen, in: Journal of Chromatography, 78, S.  
393-400, 1973.
- (53) Scherrmann J. M., Hoellinger H., Nam N. H., et al.,  
Detection and quantitation of cannabinoids  
in biological fluids: Specificity and kine-  
tics after smoking, Clin. Toxicol., 18,  
pp 565-571, 1981.

- (54) Täschner K. L., Das Cannabis - Problem, Akademische Verlagsgesellschaft Wiesbaden, 1979.
- (55) Tashkin D. P., Caivarese B., Simmons M., Respiratory status of 75 chronic marijuana smokers: Comparison with matched controls, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California; Abstract in: Am. Rev. Resp. Dis., 117: (4-Part 2) 261, 1978.
- (56) Teale J. D., Forman E. J., King L. J., Pfall E. M., Marks V., The development of a radioimmunoassay for cannabinoids in blood and urine, in: J. Pharm. Pharmac., 27, pp 465-472, 1975.
- (57) Wall M. E., Perez-Reyez M., The metabolism of delta-9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in man, in: Clin. Pharmacol., 21, p 178, 1981.
- (58) Wall M. E., et al., Metabolism, disposition and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women, in: Clin. Pharmacol. Ther., 34, pp 352-363, 1983.
- (59) Williams E. G., Himmelsbach C. K., Wikler A., Ruble D. C., Lloyd Jr. B. J., Studies on marijuana and pyrahexyl compound, Publik Health

Rep. 61, pp 1959-1983, 1946.

(60) Williams P. L., Morfat A. C., King L. J., Combined High-Pressure Liquid Chromatography and Radioimmunoassay Method for the Quantification of delta 9-Tetrahydrocannabinol and Some of Its Metabolites in Human Plasma, in: Journal of Chromatography, 186, pp 595-603, 1979.

(61) Williams P. L., Morfat A. C., Identification in human urine of delta 9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite, in: J. Pharm. Pharmacol., 32, pp 442-448, 1980.

(62) Williams P. L., Confirmation of EMIT Cannabinoid Assay Results by Bonded Phase Absorption with Thin Layer Chromatography, J. Forensic, 29 (3), pp 469-473, 1983.



## Danksagung

Für die guten Arbeitsmöglichkeiten und die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte im Institut für Rechtsmedizin sei Herrn Prof. Dr. med. W. Spann herzlich gedankt.

Für die Vergabe des Themas der Doktorarbeit und den beratenden Beistand während der experimentellen und theoretischen Erstellung der Arbeit danke ich besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. L. v. Meyer.

Auch Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Drasch möchte ich für seine vielen praktischen Hilfestellungen, insbesondere im Umgang mit dem Computer, meinen Dank aussprechen.

Den Mitarbeitern der toxikologischen Abteilung des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

## Lebenslauf

Am 16. Oktober 1961 kam ich, Klaus Blaser, in Traunstein als erstes Kind von Arthur und Irene Blaser, geb. Leidl, zur Welt.

Nach vier Jahren Grundschule besuchte ich von 1972 bis 1981 das Maristengymnasium Fürstenzell, wo ich im gleichen Jahr mein Abitur absolvierte.

Nach dem Grundwehrdienst studierte ich ab dem Sommersemester 1982 an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Fach Zahnheilkunde.

Am 04. August 1987 wurde mir nach zehn Semestern Studium und bestandenem Examen die Approbation als Zahnarzt erteilt.







